台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.66 No.2 2017

Review Article

87 Mechanisms of Salt Tolerance in Rice Plants: Cell Wall-Related Genes and Expansins
Ching Huei Kao

Research Articles

94 Studies on Microspore Culture of *Brassica oleracea* var. *botrytis* L.
Chi-Ni Hsia, Uei-Chern Chen, Chin-Yi Tsao, Yi-Mei Chou, and Tzu-Kai Lin

105 Simultaneous Quantification of Seven Coumarins in *Angelica dahurica* (Bai Zhi) Using Ultra Performance Liquid Chromatography and Its Whitening Efficiency Assessment
Shu-Chin Lo

113 Effects of Roasting Conditions on the Functional Components of Sesame
Rong-Cing Huang, Hsien-Cheng Tso, Chien Chu, and Ya-Lin Lee

126 Effects of Pre-Harvest Water Management on Quantitative Changes of Quality Attributes in 'Ponkan' Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco)
Chia-Hui Tang

134 Biosafety Assessment of GM Banana: The Effect on Microflora Community in Rrhizosphere Soil
Han-Wei Chen, Jing-Wen Chen, Ching-Shan Tseng, Min-Tze Wu, and Yuan-Kai Tu

146 Effect of Explant Type and Ribavirin Treatment on Virus Elimination of *Phalaenopsis* spp.
Chi-Ni Hsia, Chin-Chih Chen, Nan-Hsin Lin, and Wei-Ting Tsai

158 Circular Spot of Sweet Potato Caused by *Sclerotium rolfsii* in Taiwan
Chiao-Wen Huang, Hong-Ren Yang, Ching-Yi Lin, Sui-Li Hsu, Su-Yu Lai, Wen-Chi Ko, and Hui-Fang Ni

Short Communication

167 *Auricularia polytricha* Extracts Improve Blood Lipid Blood Sugar Metabolism and Bone Density of Ovariectomized Rats
Hui-Ting Yang, Hung-Chun Liu, and Shu-Hui Yang

ISSN 0022-4847
9 770022 484003

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究 JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH Vol.66 No.2 2017

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.66 No.2 2017

專題論述

87 水稻耐鹽之機制：細胞壁相關基因與擴展蛋白
高景輝

研究報告

94 花椰菜小孢子培養技術之研究
夏奇鈮、陳威臣、曹進義、周宜玫、林子凱

105 以超高效能液相層析法快速同時定量分析白芷 7 種香豆素成分及美白活性之評估
羅淑卿

113 焙炒處理對胡麻機能性成分之影響
黃榮清、左先正、初建、李雅琳

126 採收前水分管理對椪柑果實貯藏中品質變化之影響
唐佳惠

134 基改香蕉生物安全評估：對根圈土壤微生物相之影響
陳涵葳、陳敬文、曾清山、吳明哲、杜元凱

146 利用不同培植體配合利巴韋林處理對蝴蝶蘭去病毒之影響
夏奇鈮、陳金枝、林南欣、蔡娟婷

158 由 *Sclerotium rolfsii* 引起之甘藷白絹病
黃巧雯、楊宏仁、林靜宜、許淑麗、賴素玉、柯文琪、倪蕙芳

研究簡報

167 木耳萃取物改善卵巢切除大鼠血脂血糖代謝及骨質密度
楊惠婷、劉虹君、楊淑惠

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所作物組

領域主編（按筆劃序）

王強生／國立中興大學農藝學系
王淑珍／國立台灣大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
吳文哲／國立台灣大學昆蟲學系
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
沈偉強／國立台灣大學植物病理與微生物學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
柯俊成／國立台灣大學昆蟲學系
高景輝／國立台灣大學農藝學系
張永和／靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業試驗所植物病理組
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳宗禮／國立中興大學農藝學系
陳郁蕙／國立台灣大學農業經濟學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
曾夢蛟／國立中興大學園藝學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／國立台灣大學園藝暨景觀學系
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
簡立賢／國立中興大學應用經濟學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

編輯助理

吳惠卿／農業試驗所技術服務組
顧佩容／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

編輯助理顧問

吳宜晏／農業試驗所技術服務組

台灣農業研究

第六十六卷　第二期　　　中華民國一〇六年六月三十日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　陳駿季
總編輯　楊純明
地址　41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　http://aspers.airiti.com/JTAR

編印　Airiti Press Inc.
地址　23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店／ 10485 台北市松江路 209 號 1 樓／電話 : (02) 2518-0207
國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場／ 40042 台中市中山路 6 號／電話 : (04) 2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(2):87–93 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06602.01

Review Article

Mechanisms of Salt Tolerance in Rice Plants: Cell Wall-Related Genes and Expansins

Ching Huei Kao[1,*]

Abstract

Kao, C. H. 2017. Mechanisms of salt tolerance in rice plants: Cell wall-related genes and expansins. J. Taiwan Agric. Res. 66(2):87–93.

Inhibition of crop productivity by salt stress is mainly due to its impact on crop growth. Cell wall is an important component of plant biomass. Salt stress inhibits growth through affecting cell wall loosening. Expansins are cell wall proteins that promote wall loosening. Thus, cell wall-related genes and expansins play roles in regulating salt stress tolerance. The present review summarizes the major research advances in elucidating the importance of cell wall-related genes and expansins in salt stress tolerance.

Key words: Cell wall, Expansin, Rice, Salt stress.

INTRODUCTION

Soil salinity is a severe abiotic stress in agriculture. About 20% of the world's cultivated lands are influenced by salinity (Wu & Cheng 2014). Rice is an important staple food for most if not all Asian people. Rice plants encounter many abiotic stresses, while salt stress is an important constraint limiting rice yield. Generally, rice is sensitive to salt stress. Sensitivity of rice to salt stress varies with the growth stage, very sensitive at young seedling stages and less so at reproduction (Flowers & Yeo 1981; Lutts *et al*. 1995). In contrast, rice is considered to be relatively more salt tolerant at germination (Heenan *et al*. 1988; Khan *et al*. 1997). The problem of salt stress can be improved by irrigation management practices in salt-affected area. However, this approach is not easy to implement on a large scale. Introduction of salt-tolerant varieties in the salt-affected area is another alternative to improve the problem of salt stress. It appears that development of salt-tolerant rice varieties is the most efficient approach to reduce yield caused by salt stress.

When growing in saline soils, roots have to cope with two types of stresses. The first of these is an osmotic stress resulting from salt concentration in the soil that results in lowered water potential and a consequent loss of cell turgor in roots. The second is ionic stress induced by changes in the concentrations of Na^+, Cl^- or both in the root-growing medium and within root tissues. These stresses in turn cause a reduction in the water uptake and inhibition of plant growth (Lin & Kao 2001). The growth inhibition caused by salt stress of plants is due to the restriction of growth by retarding cell extension or expansion. The plant cell wall is a rigid wall responsible for the size and the shape of the cell. It is a polymeric network of crystalline cellulose microfibrils embedded in a hydrophilic matrix of hemicelluloses, pec-

Received: August 2, 2016; Accepted: October 3, 2016.
* Corresponding author, e-mail: kaoch@ntu.edu.tw
1 Professor Emeritus, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

tins and proteins (Varner & Lin 1989; Cho *et al*. 2009). The plant cell wall has high tensile strength and must be loosened to enable the cell to grow (or enlarge irreversibly) (Cosgrove 2005). Cell extension is driven by turgor generated by water uptake. In other words, wall expansion requires cell turgor pressure to stretch the cell wall and put the network of interlinked cellulose microfibrils under tension. Salt stress may restrict cell expansion by affecting the uptake rates of water, turgor generation and/or cell wall properties. It is now clear that changes in wall properties indeed occur during salt stress. Thus, salt stress may inhibit growth through affecting cell wall loosening. Alternatively, growth inhibition caused by salinity may be associated with cell wall stiffening (Neumann *et al*. 1994). Salt stress has been shown to regulate cell wall-related genes (Fan *et al*. 2013; Zagorchev *et al*. 2014). It is believed that the cell wall may play an important role in salt tolerance. Previously, we have described the regulatory role of compatible solutes, aquaporings, Na^+ transporters, and reactive oxygen species-scavenging systems in salt tolerance of rice plants (Kao 2015a, 2015b, 2017). Here, we briefly describe the possible role of cell wall-related genes in salt tolerance of rice plants. Expansins are proteins that promote wall lossening. Thus, the functional importance of expansns in salt tolerance of rice plants is also discussed in this review.

CELL WALL-RELATED GENES AND RICE SALT TOLERANCE

To understand the processes of cell wall biosynthesis, modification and degradation, Sharma *et al*. (2011) assessed the transcriptional dynamics during enzymatic removal and regeneration of rice cell walls in suspension cells over time. They demonstrated that rice lines carrying Tos17 mutations in genes upregulated during cell wall removal exhibit dwarf phenotype. The observed dwarf phenotypes suggest that these genes might be involved in cell wall-related function.

Porteresia coarctata is a halophyte which can grow in salt conditions corresponding to 500–650 mM NaCl (Sengupta *et al*. 2008). It is a close wild relative of rice and represents an important source of genes related to salt tolerance (Latha *et al*. 2004; Sengupta *et al*. 2008). There are reports showing that engineering of some genes related to inositol metabolic pathway from *Porteresia* can confer salt tolerance in tobacco (Majee *et al*. 2004) and in cultivated rice (Sengupta *et al*. 2008). In order to identify the candidate genes involved in salt tolerance, Garg *et al*. (2014) analyzed gene expression of *Porteresia* under salt stress conditions and demonstrated that one of the key metabolic pathways involved in salt tolerance is cell wall structures. These results suggest that genes related to cell wall structures are important for designing salt tolerance rice plants.

The knowledge of drought stress transcriptomes in rice are mostly relying on the comparative studies of diverse genetic background under drought conditions. A more reliable approach is to use near-isogenic lines (NILs) with a common genetic background but contrasting levels of tolerance to drought stress under water deficit. Moumeni *et al*. (2011) examined two pairs of NILs in IR64 background with contrasting drought tolerance. They found that genes, such as cellulose synthase-like family, are highly activated under drought stress in two tolerant NILs. Their data suggest that these genes in root tips of tolerant rice under drought stress resulted in enhanced root growth and elongation.

All the experiments discussed above seem to strengthen the idea that cell wall plays a central role in enhancing salt tolerance in rice plants.

EXPANSINS

Discovery

Growing plant cells characteristically exhibit acid growth. Isolated cell walls also

exhibit this phenomenon. At neutral pH, the cell walls soon stop extension, but they rapidly extend when pH is lowered (Cosgrove 2000). This acid-induced extension is not merely a physical property of wall polysaccharides, but requires active wall proteins (Cosgrove 1989). When the acid-growth behavior of isolated walls is eliminated by heat or protease treatment, it can be almost fully restored by the addition of purified wall proteins (McQueen-Mason *et al*. 1992). The active wall proteins were named as expansins, which are hypothesized to stimulate cell wall extension by disrupting non-covalent interactions between hemicellloses and crystalline cellulose microfibrils (Cosgrove 2005).

Nomenclature

Expansins were first identified from cucumber hypocotyl walls (McQueen-Mapson *et al*. 1992). The availability of the full-genome sequences of Arabidopsis and rice permits the genome-wide search of expansin gene sequences. The results of genome-wide search have revealed that expansin genes contain four subfamilies (Choi *et al*. 2006). They are α-expansin (*EXPA*), β-expansin (*EXPB*), expansin-like A (*EXLA*), and expansin-like B (*EXLB*). In rice, there are 34 *OsEXPA*, 18 *OsEXPB*, 4 *OsEXLA*, and 1 *OsEXLB* (AbuQamar 2014). It is now clear that expansin-like genes evolved from the common ancestor with *EXPA* and EXPB. However, we do not know the actual function of expansin-like genes. Recently, Boron *et al*. (2015) demonstrated that AtEXLA2 may function as a positive regulator of cell elongation in the dark-grown hypocotyl of Arabidopsis by possible interference with cellulose metabolism.

Role in growth of rice plants

Rapid intermodal elongation of deepwater rice occurs upon submergence (Kende 1998). The expression of α- and β-expansin genes is correlated with internodal growth (Cho & Kende 1997; Huang *et al*. 2000; Lee & Kende 2001). Rice coleoptile is also able to elongate under submergence. Expression of *OsEXPA4* and *OsEXPA2* in rice coleoptile is greatly induced by submergence (Huang *et al*. 2000). Choi *et al*. (2003) generated transgenic rice plants that expressed sense and antisense expansin gene *OsEXPA4*. They found that the overexpression and antisense of *OsEXPA4* enhance and decrease growth of rice seedlings, respectively. *OsEXPA8* is a root-specific α-expansin gene. Ma *et al*. (2013) provided direct evidence that overexpression of this root-specific expansin gene increases plant height, enhances leaf number, enlarges leaf size, and improves root system architecture (longer primary roots, more lateral roots and root hairs) (Ma *et al*. 2013). Atomic force microscopy (AFM) technology is now able to measure living cell wall stiffness alternation. They clearly demonstrated that overexpression of *OsEXPA8* enhances cell wall extensibility of suspension rice cells. In another experiment of the same group, the importance of *OsEXPA3* gene in root system development in rice was examined via RNAi strategy (Qiu *et al*. 2014). They provided strong evidence showing that RNAi rice plants exhibit root growth inhibition, which is mostly due to the poorer root system architecture. Recently, Zou *et al*. (2015) identified a rice β-expansin gene, *OsEXPB2*, which is predominately in roots of rice. Based on the results of subcellular localization assay, they found that *OsEXPB2* is localized in the cell wall. In order to know the functions of *OsEXPB2*, RNA interference (RNAi) was used to inhibit gene expression. They clearly showed that RNAi transgenic lines had less-developed root systems. In other words, *OsEXPB2* plays key role in regulation of root system architecture and has the potential to be utilized in transgenic root breeding to improve abiotic stress tolerance. It appears that expansins are indispensable for the growing tissues of rice seedlings.

Improvement of rice plants to salt stress

Halophytes are land plants that are able to grow under high salt conditions. Hwang *et al*.

(2013) isolated three α-expansin genes (*SjEXPAs*) from *Suaeda japonica*, a halophyte. They demonstrated that expression of *SjEXPAs* does not show any remarkable change at different NaCl concentrations, suggesting that *EjEXPAs* may play a role in the unaffected seedling growth of *S. japonica* in a high-salt environment. There are only a few reports have evaluated the effect of salt stress on the expression of expansin genes and the abundance of expansin proteins. From the two-dimensional proteome analysis, Pitann *et al*. (2009) have shown that a decrease in β-expansin protein in a salt-sensitive maize cultivar, whereas β-expansin level in a resistant cultivar is less affected by salt stress. Similarly, Geilfus *et al*. (2010) demonstrated that reduced expression β-expansin protein correlates positively with reduced shoot growth of salt-sensitive maize cultivar under salt stress. The decrease of this expansin protein is due to the down-regulation of *ZmEXPB2*, *ZmEXPB6*, and *ZmEXPB8* expression. In contrast, the maintenance of shoot growth in salt-tolerant maize cultivar is related to an unaffected β-expansin protein in the shoot. Improvement of salt tolerance has been shown in overexpression of a wheat expansin gene, *TaEXPB23*, and a rose expansin gene, *RhEXPA4*, in tobacco and Arabidopsis, respectively (Han *et al*. 2012; Lu *et al*. 2013). Recently, Qin *et al*. (2014) demonstrated that the expression of *OsEXPA3* is upregulated by NaCl stress, suggesting that *OsEXPA3* might have great potential in improving salt tolerance of rice plants. Further work will be required to examine the response of *OsEXPA3* or other expansin genes by transgenic and genetic studies.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

The adverse effect of Na^+ and/or Cl^- on plants is called salt stress. Crop yield is severely affected by salt stress. This occurs directly due to the impact of salt stress on crop growth. An important element to plant biomass is the cell wall. The role of the plant cell wall in growth is emerging in recent years. Endler *et al*. (2015) identified a protein family whose members are components of the cellulose synthesizing machinery in Arabidopsis. Their results revealed that mutation of these proteins led to salt-sensitive phenotypes and proposed a mechanism for how plants maintain the biomass producing capacity under salt stress conditions. It is probably that investigations into the role of sustained cellulose synthesis in rice plants during salt stress will be initiated. There is no doubt that expansins have the potential to be utilized as targets for improving stress tolerance of rice plants. However, much remains to be discovered about the role of expansins in salt stress tolerance of rice plants. Future research needs to emphasize on the genetic modification of expansin expression in rice plants.

REFERENCES

AbuQamar, S. 2014. Expansins: Cell wall remodeling proteins with a potential function in plant defense. J. Plant Biochem. Physiol. 2:e118.

Boron, A. K., B. Van Loock, D. Suslov, M. N. Markakis, J. P. Verhelen, and K. Vissenberg. 2015. Over-expression of *AtEXLA2* alters etiolated Arabiopsis hypocotyl growth. Ann. Bot. 115:67–80.

Cho, T. and H. Kende. 1997. Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. Plant Cell 9:1661–1671.

Cho, W. K., X. Y. Chen, H. Chu, Y. Rim, S. Kim, S. T. Kim, S. W. Kim, Z. Y. Park, and J. Y. Kim. 2009. Proteomic analysis of the secetome of rice calli. Physiol. Plant. 135:3313–3341.

Choi, D., H. T. Cho, and Y. Lee. 2006. Expansins: Expanding importance in plant growth and development. Physiol. Plant. 126:511–518.

Choi, D., Y. Lee, H. T Cho, and H. Kende. 2003. Regulation of expransin gene expression affects growth and development in transgenic rice plants. Plant Cell 15:1386–1398.

Cosgrove, D. J. 1989. Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. Planta 177:121–130.

Cosgrove, D. J. 2000. Expansive growth of plant cell walls. Plant Physiol. Biochem. 38:109–124.

臺灣農業研究66(2) 01-高景輝.indd 90 2017/6/12 下午 08:58:52

Cosgrove, D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6:850–861.

Endler, A., C. Kesten, R. Schneider, Y. Zhang, A. Ivakov, A. Froehlich, N. Funke, and S. Person. 2015. A mechanism for sustained cellulose synthesis during stress. Cell 162:1353–1364.

Fan, F., L. Nie, P. Jiang, J. Feng, S. Lv, X. Chen, H. Bao, J. Guo, F. Tai, J. Wang, W. Jie, and Y. Li. 2013. Transcriptome analysis of *Salicornia europaea* under saline conditions revealed the adaptive primary metabolic pathways as early events to facilitate salt adaptation. PLoS One 8(11):e80595.

Flower, T. J. and A. R. Yeo. 1981. Variability in the resistance of sodium chloride salinity within rice (*Oryza sativa* L.) varieties. New Phytol. 99:363–373.

Garg, R., M. Verma, S. Agrawal, R. Shankar, M. Majee, and M. Jain. 2014. Deep transcriptome sequencing of wild halophyte rice, *Porteresia coarcta*, provide novel insights in the salinity and submergence tolerance factors. DNA Res. 21:89–94.

Geilfus, C. M., C. Zorb, and K. H. Muhling. 2010. Salt stress differentially affects of growth-mediating β-expansin in resistant and sensitive maize (*Zea mays* L.). Plant Physiol. Biochem. 48:993–998.

Han, Y. Y., A. X. Li, F. Li, M. R. Zhao, and W. Wang. 2012. Characterization of a wheat (*Triticum aestivum* L.) expansin gene, *TaEXPB23*, involved in the abiotic stress response and phytohormone regulation. Plant Physiol. Biochem. 54:40–58.

Heenan, D. P., L. G. Lewin, and D. W. McCaffery. 1988. Salinity tolerance in rice varieties at different growth stages. Aust. J. Exp. Agric. 28:343–349.

Huang, J., T. Takano, and S. Akita. 2000. Expression of α-expansin genes in young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.). Planta 211:467–473.

Hwang, S. T., S. K. Kim, J. G. Na, J. S. Lee, and D. Choi. 2013. Isolation and characterization of expansin genes in a halophyte, *Suaeda japonica*. J. Life Sci. 23:182–189.

Kao, C. H. 2015a. Mechanisms of salt tolerance in rice plants: Compatible solutes and aquaporins. Crop Environ. Bioinform. 12:73–82.

Kao, C. H. 2015b. Mechanisms of salt tolerance in rice plants: Na^+ transporters. Crop Environ. Bioinform. 12:113–119.

Kao, C. H. 2017. Mechanisms of salt tolerance in rice plants: Reactive oxygen species-scavenging systems. J. Taiwan Agric. Res. 66:1–8.

Kende, H., E. van der Knaap, and H. T. Cho. 1998. Deepwater rice: A model plant to study stem elongation. Plant Physiol. 118:1105–1110.

Khan, M. S. A., A. Hamid, and M. A. Karim. 1997. Effect of sodium chloride on germination and seedling characters of different types of rice (*Oryza sativa* L.). J. Agron. Crop Sci. 179:163–169.

Latha, R., G. Hosseini Salekdeh, J. Bennett, and M. S. Swaminathan. 2004. Molecular analysis of a stress-induced cDNA encoding the translation initiation factor, *eIF1*, from the salt-tolerant wild relative of rice, *Porteresia coarctata*. Funct. Plant Biol. 31:1035–1042.

Lee, Y. and H. Kende. 2001. Expression of β-expansin is correlated with intermodal elongation in deepwater rice. Plant Physiol. 127:645–654.

Lin, C. C. and C. H. Kao. 2001. Relative importance of Na^+, Cl^-, and abscisic acid in NaCl induced inhibition of root growth of rice seedlings. Plant Soil. 237:165–171.

Lu, P., M. Kang, X. J., F. Dai, J. Gao, and C. Zhang. 2013. *RhEXPA4*, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to *Arabidopsis*. Planta 237:1547–1559.

Lutts, S., J. M. Kinet, and J. Bouharmont. 1995. Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. J. Exp. Bot. 45:1843–1852.

Ma, N., Y. Wang, S. Qiu, Z. Kang, S. Che, G. Wang, and J. Huang. 2013. Overexpression of OsExPA8, a root-specific gene, improves rice growth and root system architecture by facilitating cell extension. PLoS One 8(10):e75997.

Majee, M., S. Maitra, K. G. Dastidar, S. Pattnaik, A. Chatterjee, N. C. Hait, K. P. Das, and A. L. Majumder. 2004. A novel salt-tolerant L-*myo*-inositol-1-phosphate synthase from *Portersai coarctat* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice. J. Biol. Chem. 279:28539–28552.

McQueen-Mason, S., D. M. Durachko, and D. J. Cosgrove. 1992. Two endogenous proteins that induce cell-wall extension in plants. Plant Cell 4:1425–1433.

Moumeni, A., K. Satoh, H. Kondoh, T. Asano, A. Hosaka, R. Venuprasad, R. Serraj, A. Kumar, H. Leung, and S. Kuchi. 2011. Comparative analysis of root transcriptome profiles of two pairs of drought-tolerant and susceptible rice near-isogenic lines under different drought stress. BMC Plant Biol. 11:174.

Neumann, P. M., H. Azaizeh, and D. Leon. 1994. Hardening of root cell walls: A growth inhibitory responses to salinity stress. Plant Cell Environ. 17:303–309.

Pitann, B., C. Zorb, and K. H. Muhling. 2009. Comparative proteome analysis of maize (*Zea mays* L.)

expansins under salinity. J. Plant Nutr. Soil Sci. 122:75–77.

Qiu, S., N. Ma, S. Che, Y. Wang, X. Peng, G. Zang, G. Wang, and J. Huang. 2014. Repression of *OsEXPA3* expression leads to root system growth suppression in rice. Crop Sci. 65:2201–2213.

Schmidt, R., J. H. M. Schippers, D. Miculet, T. Obata, A. R. Femie, E. Guiderdoni, and B. Mueller-Rieber. 2013. MULTIPASS, a rice R2R3-type MYB transcription factor, regulates adaptive growth by integrating multiple hormonal pathways. Plant J. 76:258–273.

Sengupta, S., B. Patra, S. Ray, and A. L. Majumder. 2008. Inositol methyl transferase from a halophytic wild rice, *Porteresai coarctata* Roxb. (Tateoka): Regulation of pinitol synthesis under abiotic stress. Plant Cell Environ. 31:1442–1459.

Sharma, R., F. Tan, K. H. Jung, M. K. Sharma, Z. Peng, and P. C. Ronald. 2011. Transcriptional dynamics during cell wall removal and regeneration reveals key genes involved in cell wall development in rice. Plant Mol. Biol. 77:391–406.

Varner, J. E. and L. Lin. 1989. Plant cell wall architecture. Cell 56:231–230.

Wu, W. and S. Cheng. 2014. Root genetic research, an opportunity and challenge to rice improvement. Field Crops Res. 165:111–124.

Zagorchev, Z., P. Kamenova, and M. Odjakova. 2014. The role of plant cell wall proteins in response to salt stress. Sci. World J. doi:10.1155/2014/764089.

Zou, H., Y. Wenwen, G. Zang, Z. Kang, Z. Zhang, J. Huang, and G. Wang. 2015. *OsEXPB2*, a β-expansin gene, is involved in rice root system architecture. Mol. Breeding 35:41.

水稻耐鹽之機制：細胞壁相關基因與擴展蛋白

高景輝 [1,*]

摘要

高景輝。2017。水稻耐鹽之機制：細胞壁相關基因與擴展蛋白。台灣農業研究 66(2):87–93。

鹽分逆境影響作物生長進而降低產量。細胞壁是生質量 (biomass) 之主要成分。鹽分逆境經由影響細胞壁鬆軟而抑制生長。擴展蛋白 (expansins) 是鬆軟細胞壁之蛋白。因此，細胞壁相關基因與擴展蛋白對作物調控鹽分逆境耐性扮演重要功用。本文說明細胞壁相關基因與擴展蛋白在水稻耐鹽重要性之主要研究進展。

關鍵詞：細胞壁、擴展蛋白、水稻、鹽分逆境。

投稿日期：2016 年 8 月 2 日；接受日期：2016 年 10 月 3 日。
* 通訊作者：kaoch@ntu.edu.tw
[1] 國立台灣大學農藝學系名譽教授。台灣 台北市。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(2):94–104 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06602.02

研究報告

花椰菜小孢子培養技術之研究

夏奇鋁[1,*]　陳威臣[2]　曹進義[3]　周宜玫[4]　林子凱[5]

摘要

夏奇鋁、陳威臣、曹進義、周宜玫、林子凱。2017。花椰菜小孢子培養技術之研究。台灣農業研究 66(2):94–104。

花椰菜 (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) 是台灣的重要蔬菜，但有關花椰菜小孢子培養的研究甚少。本研究以台灣花椰菜商業一代雜交品種 (F_1) 為材料，測試各品種小孢子培養之反應，並建立胚誘導及胚發芽所需條件，生產雙單倍體 (doubled haploid; DH) 植株作為培育純系之用。花椰菜 8 個 F_1 品種之小孢子於不同批次，以相同接種濃度 (4×10^4 microspores mL^{-1}) 培養於 NLN-13 培養液中，並以 32℃分別處理 1 d 或 3 d，8 品種中以「農友極早生」及「慶農 S-65」有較高之胚形成率，而「慶農 H-42」、「慶農 H-46」及「農友嬌雪」則未有胚形成。「農友極早生」以含有 13% 蔗糖之全量及半量 NLN 鹽類濃度培養基與 32℃處理時間 (1、2 及 3 d) 組合進行複因子試驗，結果顯示 32℃處理時間、培養基鹽類濃度以及兩者間的交感效應影響皆極為顯著 ($P < 0.01$)，其中以 1/2 NLN-13 培養基配合 32℃處理 1 d 可獲得 12.0 胚/皿最高。將「農友極早生」及「慶農 S-65」小孢子培養而來之子葉期胚繼代於 B5 培養基中培養 4 wk，發現僅有少數胚正常發芽 (2.1% 及 4%)，多數胚未能正常生長且伴隨有二次再生組織長出，將未正常發芽之培植體依其形態分類後，先繼代於含有 BA 之培養基中預培養 1 wk，再繼代於不含生長調節劑之培養基中培養 4 wk，結果兩品種皆以胚軸上長有再生組織之培植體有最高之小苗分化率，分別為「農友極早生」的 66.7%，及「慶農 S-65」的 86.9%。以流式細胞儀檢測「農友極早生」及「慶農 S-65」出瓶小苗之染色體倍體數，兩品種之 2 倍體比率分別為 58.8% 及 56.3%，DH 植株比例皆超過 50%。

關鍵詞：花椰菜、小孢子、雙單倍體。

前言

台灣蔬菜種苗產業從早期接受國外種子公司委託採種開始逐漸發展，在採種技術成熟後遂開發自有品種，目前國內蔬菜種苗業者在花椰菜擁有許多廣受市場歡迎的優良品種，不僅供應台灣農民所需，並外銷至鄰近的亞熱帶國家與中國大陸 (Lo *et al*. 2012)。蔬菜育種是具有高度技術門檻的產業，市場上對於種子純度及其耐候、抗病等特性的改進，有相當高的要求，業者不但要堅守品質，還必須不斷推陳出新，方能在競爭劇烈的市場中保有一席之地 (Wang *et al*. 2012)。一代雜交品種 (F_1) 因具有雜種優勢及高整齊度的特性而廣受農民歡迎，在生產 F1 種子的育種流程中，純系親本的育成扮演了舉足輕重的角色，一般同質純系親本的育成需時6–8年，但若作物具有自交不親和性以及自交弱勢等障礙，則自交純系育成的難度提高，成為新品種育成首要克服的瓶頸。十字花科作物具有自交不親和性，以傳統自交

投稿日期：2016 年 10 月 13 日；接受日期：2016 年 3 月 18 日。
* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
3 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。
4 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。
5 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。

方式育成純系，在人力及時間上投入的成本較高，若要快速因應市場變化推出新品種，必須提高純系親本育成之效率。

花藥培養是在離體 (*in vitro*) 狀態下對花藥進行人工培養，透過培養環境的變化達到改變花粉發育途徑的目的，亦即誘導花粉由原本配子體發育路徑轉為孢子體發育，並長成單倍體植株，過程中小孢子或直接分化為胚，或先形成癒傷組織再發育成胚。花藥培養的目的除了獲得單倍體作為隱性基因選拔之用外，主要在獲得染色體倍加的同質雙單倍體 (doubled haploid; DH)，DH 一般可藉由秋水仙素 (colchicine) 處理單倍體植株獲得，或於組織培養過程中藉由染色體自然倍加而產生。自交作物之 DH 可直接固定成為純系品種，省去 5–6 代自交的時間；異交作物之 DH 則可作為培育 F_1 品種之純系親本，或利用 DH 具有遺傳同質性的特性作為測試親。綜合言之，經由花藥培養獲得 DH 應用在育種上，不僅可縮短育種年限，並能提高選拔效率 (Forster & Thomas 2005)。

蕓苔屬 (*Brassica*) 植物的單倍體最早由 Thomas & Wenzel (1975) 自大油菜 *Brassica napus* 以及 Keller *et al*. (1975) 自小油菜 *Brassica campestris* 的花藥成功培養出來；但 Lichter (1982) 發展出油菜小孢子培養技術後，大多數蕓苔屬蔬菜皆改採小孢子培養以獲得 DH 植株，原因是從小花蕾中取出花藥非常耗費人力，每人每日可取得的花藥數量相當有限;反之，每個花藥中含有數以萬計的小孢子，只需簡單的壓擠動作即可將數量可觀的小孢子自花蕾中釋放出來。花藥培養的另一缺點是小孢子位於花藥之內，難以觀察其再生細胞的來源，再生植株有可能來自於花藥壁組織而非小孢子 (Ferrie & Caswell 2011)。此外，許多花藥培養經由癒傷組織間接再生的過程，提高了遺傳變異產生的可能性；反觀小孢子培養，在培養初期即已清楚的將其他體細胞加以排除，再生植株明確發育自小孢子。以蕓苔屬植物為例，小孢子的再生路徑為直接發育為胚，降低了遺傳變異發生的機率。更進一步比較小孢子培養與花藥培養而來的再生族群，顯示前者染色體倍體數的差異化較小亦為其優點。因此，雖然小孢子培養的操作技術較高、過程較繁複，配合試驗所需的儀器設備亦較多，但以油菜為例，小孢子培養的效率達花藥培養的 10 倍，目前十字花科蔬菜 DH 的育成大都採用小孢子培養，原因即在此 (Custers 2003)。

十字花科蔬菜是台灣非常重要之蔬菜，相關栽培及育種之研究相當豐富，但有關花藥培養的研究則甚少 (Chang *et al*. 1996)，小孢子培養技術更付之闕如，亟需學研單位積極投入並迎頭趕上。本研究以台灣花椰菜商業 F_1 為材料，測試各品種之小孢子培養反應，並建立胚誘導及發芽所需之條件，生產 DH 植株作為純系之用，加速 F_1 品種之育成。

材料與方法

花椰菜商業 F_1 種子分別為購自慶農種苗有限公司 (Ching Long Seed Co., Ltd., Tainan, Taiwan) 的「H-37」、「H-42」、「H-46」、「M-45」、「S-65」，欣樺種苗貿易有限公司 (Singflow Seed Trading Co., Ltd., Tainan, Taiwan) 的「旭雪」以及農友種苗 (Known-you Seed Co., Ltd., Kaohsiung, Taiwan) 的「嬌雪」、「極早生」等品種。將種子播種於泥炭土與蛭石 1 : 1 混合介質中，種子發芽 3 wk 後，假植至含有相同介質的 3 寸盆中，待花椰菜苗本葉達 4–5 片時，定植於 10 寸盆中，置於日/夜溫 20℃/10℃、光照 16 h、光照強度為 85 mol m^{-2} s^{-1} 之人工氣候室內生長至開花。生長期間每週施用 1 次 1 g L^{-1} 花寶 2 號 (N : P_2O_5 : K_2O = 20 : 20 : 20) 液肥，花芽分化後改施濃度相同之花寶 3 號 (N : P_2O_5 : K_2O = 10 : 30 : 20) 液肥。

分離小孢子之操作流程修改自 Custers (2003)。剪下小花序進行小花蕾分級，若未特別註明則是以 3–4 mm 長度之小花蕾進行消毒。取 16 朵消毒好之花蕾，以針筒推進器加壓，將小孢子由花藥囊內釋出，加入 B5-13 (B5 基本鹽類添加 13% 蔗糖) 培養液後，並以 37 μm 濾網過濾，重複壓迫花蕾、過濾動作，將濾液收集於離心瓶，共約 8 mL。將 3 批次濾液收集於同一離心管，並定量至 25 mL，放入預冷至 4℃離心機，以 100× *g* 離心 6 min 後

取出。將上清液吸除後，加入 10 mL B5-13 液體培養基，重複上述離心動作 2 次，最後加入 10 mL NLN-13 (NLN 基本鹽類添加 13% 蔗糖) 或 1/2 NLN 液體培養基搖勻，製作懸浮液。取 10 μL 懸浮液以血球計數器計算小孢子數，並依實際濃度加入適量之 1/2 NLN-13 或 NLN 培養液，將小孢子懸浮濃度調整至 4×10^4 microspores mL^{-1}。取 5 mL 懸浮液置入 6 cm 培養皿，每皿並加入 0.1 mL 活性碳溶液，活性碳溶液之配製為 1 g 活性碳與 0.5 g agarose (Sigma type IX) 溶於 100 mL 水中，並經高壓滅菌後備用。培養皿以石腊膜 (parafilm) 加封後，置於 32℃恆溫箱，暗培養 24–72 h 後，移至 25℃黑暗中，靜置培養 2 wk，之後將培養皿移至光照下，以 60 rpm 震盪培養，直到幼胚分化，幼胚發育至子葉期時進行繼代。

將「農友極早生」之子葉期胚逢機接至 MSD1、MSD2 與 MSB 培養基中培養，每皿接種 20 個子葉期胚為 1 重複，1 wk 後將胚繼代至 MSS 培養基中，繼續培養 4 wk 後調查發芽率；另外將子葉期小胚繼代於裝有 MSG 培養基之 250 mL 三角瓶中培養，每瓶接種 20 個子葉期胚為 1 重複，培養 5 wk 後調查發芽率。以上 4 種處理每 1 處理共 11 重複，調查完後將已抽葉之芽體繼代至 MSS 發根培養基。培養基皆以 MS 基本鹽類 (Murashige & Skoog 1962) 為基本培養基，其中 MSD1 添加 20 g L^{-1} 蔗糖、2.0 mg L^{-1} BA 及 0.5 mg L^{-1} NAA、8.0 g L^{-1} Bacto agar。MSD2 培養基與 MSD1 培養基配方相同，但生長調節劑更改為 0.2 mg L^{-1} BA 及 0.2 mg L^{-1} IAA。MSB 培養基相同於 MSD1，但額外添加 2.0 mg L^{-1} zeatin，且以 0.1 mg L^{-1} IAA 取代 0.5 mg L^{-1} NAA。MSG 培養基添加 10 g L^{-1} 蔗糖、10 g L^{-1} 葡萄糖、0.5 g L^{-1} 活性碳及 10 g L^{-1} Bacto agar。發根之 MSS 培養基則添加 10 g L^{-1} 蔗糖、10 g L^{-1} Bacto agar。培養基配製完成後，在高壓滅菌前調整 pH 為 5.8。

將「農友極早生」及「慶農 S-65」之子葉期胚接種至 B5 固體培養基中培養 4 wk，將正常發芽之培植體繼代至不含生長素之 MSA 培養基外，其他形態之培植體先繼代至 MSD1 (「農友極早生」)、MSB (「慶農 S-65」) 培養基中培養 1 wk 後，再繼代至 MSS 培養基，於 4 wk 後調查存活數與抽芽數。MSA 培養基為 MS 基本鹽類添加 20 g L^{-1} 蔗糖與 10 g L^{-1} Bacto agar。

流式細胞儀檢測方法：切取馴化成活小植株之第 1 片成熟葉約 1 cm^2，加入 0.2 mL UV CyStain Precise T Kit 之萃取緩衝液 (Partec, Germany)，以刀片將組織切碎，再添加 0.8 mL UV CyStain Precise T Kit 之染色液後過濾，濾液靜置 3 min 後，以流式細胞儀 (Ploidy Analyzer, Partec PA, Germany) 檢測。每個芽體取樣 2 次，每一樣品檢測之細胞核數為 2,500 個。

DNA 之萃取與 PCR 反應：取參試植株約 5 mm 直徑的葉圓片置於 PCR tube 中，加入 100 μL 植物 DNA 萃取試劑 QuickExtractTM (Epicentre Co., Ltd.) 後，依據試劑套組之操作程序進行 DNA 萃取。PCR 反應使用的分子標誌 “G317”，其引子 (primers) 主要依據阿拉伯芥基因 “At5g01160” 之外顯子 (exon) 區域 DNA 序列進行設計，經測試該分子標誌於參試品種慶農 S-65 中可擴增出異質結合 (Heterozygous) 之條帶。PCR 反應總體積為 15 μL，內含 0.2 mM $MgCl_2$，0.25 mM dNTP，0.2 mM each primer，3 μL genomic DNA 及 1.0 units Taq polymerase (Invitrogen Co., Ltd.)。反應溫度條件為 94℃ 5 min 後進入循環 40 次的溫度反應 (94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 60 s)，最後以 72℃ 5 min 結束，PCR 產物以 2% agarose 進行電泳分析，再以 SYBR Safe (Invitrogen Co., Ltd.) 染劑染色照相。

結果與討論

十字花科作物自油菜 (*Brassica napus* L.) 小孢子培養以高溫逆境 (heat shock) 處理成功提高胚誘導率後 (Keller *et al*. 1987)，大幅提高了小孢子培養的成功率；培養基則以 Lichter (1982) 與 Takahata & Keller (1991) 改良自 Nitsch & Nitsch (1967) 培養基之 NLN 培養基添加 13% 蔗糖 (NLN-13) 最為常用。蕓苔屬花椰菜的小孢子培養與油菜相比，其誘導率較

低，為提高小孢子培養的成功率，必須針對花椰菜不同品種的培養條件加以修正。小孢子培養成功誘導 DH 之效率受到許多因子影響，例如培植體來源 (基因型、植株生長與開花環境、小孢子發育時期)、培養基組成 (基本鹽類、植物激素、碳源)、培養條件 (溫度處理) 等因素。逆境處理被認為是改變花粉發育途徑的重要因子 (Smykal 2000)，溫度逆境對一些花藥 (小孢子) 培養反應低的品種有一定增進之效果。蕓苔屬植物一般以 32℃高溫逆境處理 1–3 d 最常被使用 (Ferrie 2003)。本試驗執行之策略為以國內種苗公司生產之 F_1 品種為試驗材料，首先進行品種反應篩選，利用相同的培養條件來確認花椰菜不同品種的小孢子培養反應，再以反應較佳的品種為材料，改進小孢子培養之效率。

將 8 個商業 F_1 品種以 4×10^4 microspores mL^{-1} 小孢子濃度接種於 NLN-13 培養液中，並分別以高溫 32℃處理 1 d 及 3 d (表 1)。以 32℃處理 1 d 的 5 個品種中，以「農友極早生」獲得 45 個胚，平均 7.5 胚/皿最高，其次為「欣樺旭雪」及「慶農 H-37」；32℃處理 3 d 的 4 個品種中，以「慶農 S-65」以及「農友極早生」獲得較高之胚數，平均胚數分別為 24.8 胚/皿及 15.8 胚/皿，其次為「慶農 M-45」；在 32℃兩種處理時間中皆未見胚形成的品種，分別是「慶農 H-42」、「慶農 H-46」及「農友嬌雪」。8 個品種中僅「農友極早生」分別以 32℃處理 1 d 及 3 d，結果顯示每皿平均胚數以 3 d 處理組較高。因為生長箱空間的限制，各品種植株係分批於不同的時間種植，開花後並以相同條件進行小孢子培養試驗，雖然植株生長環境條件相同，但各批次植株本身的生長狀態卻不盡相同，可能因此影響小孢子的再生表現。惟上述篩選結果仍可明顯看出不同品種間小孢子培養反應的差異性，顯示品種之基因型是影響小孢子培養成功與否的重要因子。

根據上述試驗結果，以小孢子培養反應較佳的品種「農友極早生」為材料，以取自同一植株、同一批次之小孢子測試 32℃處理 1 d 及 3 d 對胚形成的影響，接種濃度同為 4×10^4 microspores mL^{-1}，但培養液改為 1/2 NLN-13，結果如表 2 所示。以 32℃處理 1 d 組獲得平均 35.5 胚/皿較高，總胚數達 888 個，明顯高於處理 3 天組之 1.6 胚/皿。此外 32℃處理 1 d 組在第 1 次取胚 (4 wk) 後繼續震盪培養 3 d，發現培養液中仍持續有幼胚發育，加總 2 次獲得的總胚數達 888 個；但 32℃處理 3 d 組在第 1 次取胚後雖然採取相同之震盪培養，卻未再有新胚產生。

「農友極早生」在上述兩試驗中對於 32℃處理時間的表現並不一致 (表 1 及表 2)，但因上述兩試驗中使用之小孢子培養液並不相同 (分別為 NLN 與 1/2 NLN)，因此進一步以全量

表 1. 不同花椰菜 F_1 品種以 32℃溫度處理不同天數對小孢子胚誘導的影響。

Table 1. Culiflower F_1 hybrids and effect of 32℃ treated duration treatments on embryo induction of microspore culture[z].

Cultivar[y]	Duration of 32℃ (d)	No. petri dish with embryos/total petri dish	Total embryos	Embryos/petri dish
Chinglong H-37	1	1/10	3	0.3
Chinglong H-42	1	0/5	0	0.0
Chinglong H-46	1	0/14	0	0.0
Singflow Bright snow (旭雪)	1	1/21	25	1.2
Known-you Farmers extra early (極早生)	1	6/6	45	7.5
Known-you Farmers extra early	3	5/12	189	15.8
Known-you Charming snow (嬌雪)	3	0/14	0	0.0
Chinglong M-45	3	6/27	8	0.3
Chinglong S-65	3	8/11	273	24.8

[z] Microspore culture medium was NLN-13 with 4×10^4 microspores mL^{-1}.
[y] Chinglong (慶農); Singflow (欣樺); Known-you (農友).

NLN 與 1/2 NLN 兩種培養基以及 32℃三種處理時間之組合進行複因子試驗，結果如表 3 所示。試驗因子影響順序依序為 32℃處理時間、培養基濃度以及兩者之交感效應，3 項因子之影響皆為極顯著 ($P < 0.01$)。6 個處理中以 1/2 NLN 培養基配合 32℃處理 1 d，可獲得 12.0 胚/皿最高，其次為同樣 1/2 NLN 培養基配合 32℃處理 2 d 以及全量 NLN 配合 32℃處理 1 d 組，平均可獲得 8.6–8.8 胚/皿。NLN-13 培養基是油菜小孢子培養最常使用的培養基配方，但蕓苔屬之不同蔬菜及其品種針對 NLN 培養基中主要鹽類的濃度或蔗糖濃度常有不同的表現 (Ferrie *et al*. 1999; Tinaoana *et al*. 2013)。複因子試驗結果顯示，除了高溫處理的影響，培養基以及兩者間的交感作用皆顯著影響小孢子的胚形成率，這也合理解釋了表 1 及表 2 兩試驗結果的不同。花椰菜「農友極早生」以 1/2 NLN 培養基培養，利用 32℃高溫處理 1 d 或 2 d，以及在 NLN 培養基中以 32℃高溫處理 1 d，皆具有較高的胚誘導率。

小孢子在液態培養基中誘導發育為胚，幼胚發育至子葉期後被繼代至固態培養基中繼續培養，並觀察子葉期胚發芽的比率，結果如表 4 所示。胚發芽率在 4 種培養基中以添加有葡萄糖之 MSG 最差，子葉期胚在 MSG 培養基中沒有生長現象，並逐漸褐化死亡。子葉期胚在 MSD1 培養基中雖然有 3.5% 存活率，但發芽比例為 0%；接種在 MSD2 與 MSB 培養基中之胚存活率相近，但胚培植體於 MSB 培養基中的發芽率較高。比較 4 種發芽培養基，MSD1 與 MSD2 主要的差別在 BA 濃度以及 auxin 的種類及濃度，但較高濃度之 BA 並未能提高發芽率，且 NAA 與 IAA 相較，較不利於胚的發育。MSD1 與 MSB 相較，顯示 zeatin 本身或是其具有提高 BA 效能的協同作用，進而提高胚發芽比率。本試驗之 MSB 培

表 2.　花椰菜「農友極早生」小孢子以 32℃處理不同天數對胚誘導之影響。

Table 2.　Effect of treated duration at 32℃ on embryo induction of microspore culture from cauliflower 'Known-you Farmers extra early'[z].

Duration of 32℃ (d)	No. petri dish with embryos/total petri dish	Total embryos	Embryos/petri dish
1	25/25	888[y]	35.5 ± 8.0 a[x]
3	18/25	40	1.6 ± 1.8 b

[z] Microspore culture medium was 1/2 NLN-13 with 4×10^4 microspores mL^{-1}.
[y] A total of 888 embryos were collected with 517 embryos from the first collection and 371 embryos from the second collection.
[x] Means with different letter(s) in the same column are significantly different ($P < 0.01$) by LSD test.

表 3.　培養基鹽類濃度及高溫處理天數對花椰菜「農友極早生」小孢子培養胚形成之影響。

Table 3.　The effect of NLN salt strength and duration of 32℃ treatment on embryo induction of microspore culture from cauliflower 'Known-you Farmers extra early'.

Medium	Duration of 32℃ (d)	Embryos/petri dish
½ NLN-13	1	12.0 ± 2.55 a[z]
½ NLN-13	2	8.8 ± 3.77 a
½ NLN-13	3	4.6 ± 3.85 b
NLN-13	1	8.6 ± 1.14 a
NLN-13	2	0.0 ± 0.00 c
NLN-13	3	3.8 ± 2.77 b
Medium		**
Duration of 32℃		**
Medium × Duration of 32℃		**

[z] Means with different letter(s) in the same column are significantly different ($P < 0.01$) by LSD test.
** significant at $P < 0.01$.

表 4. 花椰菜「農友極早生」由小孢子發育而來之子葉期胚於不同培養基中發芽之情形。

Table 4. The effect of culture media on germination of cotyledonary embryos derived from microspores of cauliflower 'Known-you Farmers extra early'.

Medium[z]	Cultured embryos	Survival embryos (%)	Shoot germination (%)
MSD1-MSS	230	3.5	0.00
MSD2-MSS	230	5.2	1.74
MSB-MSS	230	5.7	2.61
MSG	230	0.0	0.00

[z] MSD1-MS basal salts supplemented with 20 g L^{-1} sucrose, 2.0 mg L^{-1} BA, 0.5 mg L^{-1} NAA, and 8.0 g L^{-1} bacto agar. MSD2-MS basal salts supplemented with 20 g L^{-1} sucrose, 0.2 mg L^{-1} BA, 0.2 mg L^{-1} IAA, and 8.0 g L^{-1} bacto agar. MSB-MS basal salts supplemented with 20 g L^{-1} sucrose, 2.0 mg L^{-1} BA, 2.0 mg L^{-1} zeatin, 0.1 mg L^{-1} IAA, and 8.0 g L^{-1} bacto agar. MSG-MS basal salts supplemented with 10 g L^{-1} sucrose, 10 g L^{-1} glucose, 0.5 g L^{-1} active charcoal, and 10 g L^{-1} bacto agar. MSS-MS basal salts supplemented with 10 g L^{-1} sucrose and 10 g L^{-1} bacto agar.

養基與 Gu *et al*. (2014b) 發表之發芽培養基，除了以 8 g L^{-1} Bacto agar 取代 0.4% low gelling agarose 不同外，使用相同之生長調節劑及濃度，但本試驗「農友極早生」之胚發芽率僅為 2.61%。而 Gu *et al*. (2014b) 報告中測試之 16 品種中僅 1 品種未發芽，其餘 15 品種之發芽率從 19.5–82.4%，皆較本試驗為高。推測其可能原因，一為本試驗使用 cis-zeatin 而非 trans-zeatin，二者在效能上可能有差異；二為 Gu *et al*. (2014b) 在花苔發育的早期即予疏除，減少花蕾間營養之競爭，提供小孢子較佳的營養生長，並影響之後胚發芽的能力。此外，Gu *et al*. (2014a) 在黑芥 *B. nigra* 的研究中指出，子葉期早期之胚對生長調節劑的反應較為敏感，檢視本試驗繼代培養之胚皆屬於成熟之子葉期胚，推測因此對生長調節劑反應表現出差異。

以「農友極早生」及「慶農 S-65」兩品種於 NLN-13 培養液中培養並經 32℃處理 3 d 所得到之子葉期胚進行胚發芽試驗。「農友極早生」共 146 個子葉期胚繼代於 B5 培養基中，1 mo 後僅有少數胚 (3 個) 發育為正常芽體，發芽率為 2.1%；「慶農 S-65」總共繼代 225 個子葉期胚，具正常葉培植體共 9 株，發芽率為 4%。觀察大多數的子葉期胚未能正常抽芽，而是發育為伸長之胚軸、圓筒狀葉、伸長之胚根、維持子葉狀之胚以及胚軸上長出再生組織等各種形態 (圖 1)。Gu *et al*. (2014a) 在 *B. nigra* 的研究中指出，除了正常再生之植株外，於子葉及胚軸表皮細胞上發現有二次胚 (secondary

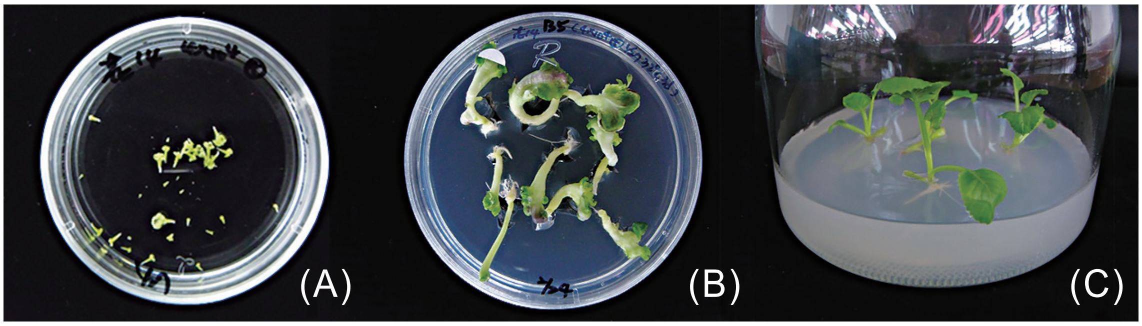


圖 1. 「農友極早生」小孢子培養。不同發育階段之小孢子胚 (A)，子葉期胚於 B5 培養基中發育為不同型態之組織 (B)，以及芽體發根 (C)。

Fig. 1. Microspore culture of cauliflower 'Known-you Farmers extra early'. Embryos in various developmental stages (A), various types of tissues derived from cotyledonary embryos cultured on B5 medium (B), and rooting of germinated shoot (C).

embryo) 長出。本試驗同樣顯示在子葉及胚軸表皮細胞上有各種再生組織長出，但觀察為器官再生 (organogenesis)，並非二次體胚的發生。將這些於 B5 培養基中發育之組織先依其形態加以分類，再繼代於含有 BA 之培養基中短暫培養 1 wk，再次繼代於不含生長調節劑之培養基中，經 4 wk 培養後調查培植體之存活率以及長出正常葉片小苗之比例 (表 5 及表 6)。「農友極早生」保持胚形態之培植體以及僅胚根伸長之培植體，兩者在繼代後皆未能繼續生長，反而褐化死亡。胚軸伸長之培植體以及具有圓筒狀葉之培植體，在繼代後僅 11.1–16.7% 培植體存活，且僅有 1 個圓筒狀葉之培植體 (3.3%) 發育為小苗。為數最多的胚軸上具有再生組織的培植體，在繼代後存活率達 73.1%，發育為小苗的比率亦達 66.7%。

「慶農 S-65」總共繼代 225 個子葉期胚，具正常葉培植體共 9 株，但有 1 株死亡，抽苗率為 88.9%。保持子葉期胚之培植體雖然存活率低，僅 31%，但 29 個胚中有 4 個胚發育為小苗，抽苗率有 13.8%。胚根伸長之培植體，在繼代後全部褐化死亡。胚軸伸長的 45 個培植體僅 24 個胚存活，但全部長成小苗，抽苗率為 53.3%。圓筒狀葉培植體繼代後培植體存活率達 66.7%，且全數發育為小苗。胚軸上具有再生組織的培植體，經繼代後存活率達 86.9%，且全數發育為小苗，是各形態培植體中抽芽率最高者 (圖 1)。

本試驗中使用之兩品種其子葉期胚於 B5 培養基上僅少數直接發育為正常芽體，大多數的胚未能正常發芽，而是發育為各種形態之組織，將這些組織依其形態加以分類，其中占最

表 5. 花椰菜「農友極早生」子葉期胚於 B5 培養基分化為不同形態之培植體經繼代培養後發芽之情形。

Table 5. Shoot germination of various explants derived from cotyledonary embryos of 'Known-you Farmers extra early' cultured on B5 medium[z].

Type of explants	No. of cultured explants	% Survival (No. of explants)	% Shoot regeneration (No. of plants)
Normal plant	3	100.0 (3)	100.0 (3)
Cotyledonary embryo	9	0.0 (0)	0.0 (0)
Radicle tissue	8	0.0 (0)	0.0 (0)
Hypocotyl tissue	18	11.1 (2)	0.0 (0)
Leaf tissue	30	16.7 (5)	3.3 (1)
Hypocotyl with regenerated tissue	78	73.1 (57)	66.7 (52)
Total no.	146	45.9 (67)	38.4 (56)

[z] Explants were cultured on MSD1 medium-MS basal salts supplemented with 20 g L^{-1} sucrose, 2.0 mg L^{-1} BA, 0.5 mg L^{-1} NAA, and 8.0 g L^{-1} bacto agar, for 1 wk before subculturing to the hormone-free MS medium for another 4-wk culturing.

表 6. 花椰菜「慶農 S-65」子葉期胚於 B5 培養基分化為不同形態之培植體經繼代培養後發芽之情形。

Table 6. Shoot germination of various explants derived from cotyledonary embryos of 'Chinglong S-65' cultured on B5 medium[z].

Type of explants	No. of cultured explants	% Survival (No. of explants)	% Shoot regeneration (No. of plants)
Normal plant	9	88.9 (8)	88.9 (8)
Cotyledonary embryo	29	31.0 (9)	13.8 (4)
Radicle tissue	20	0.0 (0)	0.0 (0)
Hypocotyl tissue	45	53.3 (24)	53.3 (24)
Leaf tissue	15	66.7 (10)	66.7 (10)
Hypocotyl with regenerated tissue	107	86.9 (93)	86.9 (93)
Total no.	225	64.0 (144)	61.8 (139)

[z] Explants were cultured on MSB-MS basal salts supplemented with 20 g L^{-1} sucrose, 2.0 mg L^{-1} BA, 2.0 mg L^{-1} zeatin, 0.1 mg L^{-1} IAA, and 8.0 gL^{-1} bacto agar, for 1 wk before subculturing to the hormone-free MS medium for another 4-wk culturing.

高比例者為伸長之胚軸且其上長有二次再生組織的培植體，將此種培植體繼代於含有 cytokinin 類之培養基中 7–10 d 後，再次繼代於不含生長調節劑的 MS 基本培養基中，大多數的培植體皆能發育為正常芽體，顯示特定形態之培植體仍具有極高之再生能力。

比較「農友極早生」及「慶農 S-65」兩品種子葉期胚直接發育為小苗之表現 (2.1%、4.0%)，以「慶農 S-65」較佳，顯示子葉期胚發育為小苗的發芽率在各品種間存有差異。兩品種在第 1 次繼代的 B5 培養基中長出之培植體，在含有生長調節劑之培養基中短暫培養後，再次繼代於不含生長調節劑之培養基中培養，兩品種之發芽率分別為 38.4% (56 株/146 胚) 及 61.8% (139 株/225 胚)，同樣以「慶農 S-65」抽芽率較「農友極早生」為高，除了品種差異影響外，推測 MSB 培養基較 MSD1 培養基對芽體再生有較佳之促進作用亦可能為原因之一。本試驗方法與 Gu *et al*. (2014b) 相較，雖然增加了 1 次 B5 培養基培養的時間，但其發表之「慶農 S-65」的發芽率僅 33.6%，而本試驗「慶農 S-65」之總發芽數可達 61.8%，表示將子葉期胚先繼代於不含生長調節劑之培養基中，有助於提高胚對於再生培養基的適當反應，在持續培養後表現出較高之發芽率。

取「慶農 S-65」馴化成活之植株共 16 株的葉片，以流式細胞儀檢測染色體倍體數 (圖 2)，其中 5 株為單倍體占 31.3%，9 株為 2 倍體占 56.3%，4 倍體及其他倍數體各 1 株，分別占 6.3%。「農友極早生」共檢測 17 株，其中 5.9% 為單倍體，58.8% 為 2 倍體，35.3% 為 4 倍體。一般而言由小孢子培養而來之再生植株具有一定比率染色體倍加之情形，自然倍加之機制推測一為染色體複製後未分開，二為

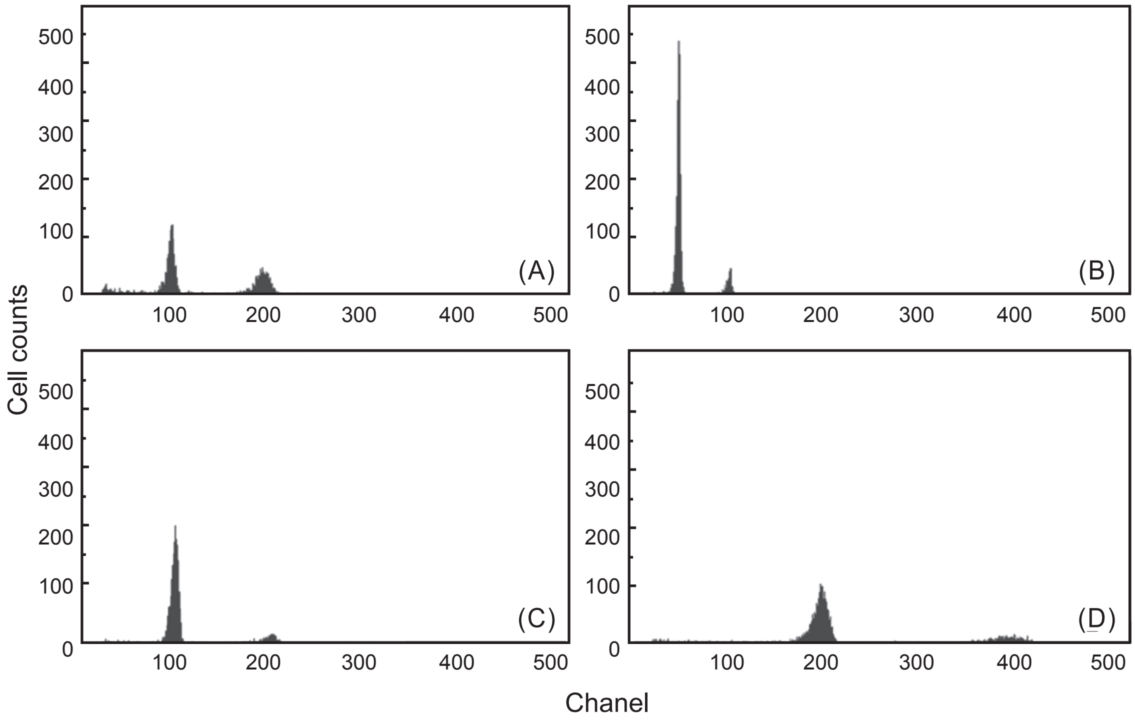


圖 2. 「慶農 S-65」小孢子培養而來之植株以流式細胞儀檢測之倍體數表現圖譜。二倍體之 F_1 植株 (A)，小孢子發育而來之單倍體植株 (B)，雙單倍體植株 (C) 及四倍體植株 (D)。

Fig. 2. Ploidy expression of microspore-derived plant of cauliflower ‘Chinglong S-65’ by flow cytomytry. F_1 microspore donor plant (A), haploid plant (B), doubled haploid plant (C), and tetraploid plant (D) derived from microspore culture.

細胞分裂後分隔膜未發育，造成兩細胞的融合 (fusion)，皆能造成細胞染色體之倍加 (Aionesei *et al*. 2005)。本研究利用可擴增出異質結合 (Heterozygous) 條帶之共顯性分子標誌，逐一檢測 F_1 供試植株、小孢子培養分化而來之 2 倍體及單倍體植株。圖 3 中顯示 F_1 植株為異質結合體，而小孢子培養分化而來之 2 倍體及單倍體植株皆為同質結合體，證明小孢子培養分化而來之 2 倍體，並非由體細胞分化而來之異質結合體，而是同質結合之 DH。Gu *et al*. (2014b) 使用「慶農 S-65」作為小孢子培養材料，其再生植株染色體倍體數的表現分別為單倍體 8.2%，2 倍體 32.7%，4 倍體 36.7%。本試驗中「慶農 S-65」之單倍體比率為 31.3%、2 倍體為 56.3%，可作育種利用之 2 倍體表現方面較其為佳。「慶農 S-65」與「農友極早生」兩品種小孢子培養之再生植株其 DH 比率皆超過 50%，可以不考慮施用秋水仙素進行染色體之倍加 (表 7)。

結論

小孢子培養誘導同質雙單元體之形成受基因型影響大，同一物種之不同品種於相同培養條件下的反應並不相同，為提高培養成功率必須針對各品種所需之培養條件加以改進。「農友極早生」及「慶農 S-65」兩品種是參試的 8 個品種中反應較佳者，「農友極早生」以 1/2 NLN-13 為小孢子培養液、接種濃度 4 × 10^4 microspores mL^{-1}，於 32℃處理 1 d 的培養條件下，可獲得 12.0–35.5 胚/皿。小孢子發育而來之子葉期胚先於 B5 培養基中培養，再短暫繼代於含有生長調節劑的誘導培養基中培養 1 wk，可以獲得 66.7% 之發芽率，出瓶成活植株中，2 倍體占 58.8%。「慶農 S-65」以相同方式培養發芽率更達 86.9%，出瓶成活植株中，2 倍體占 56.3%。本研究建立之花椰菜小孢子培養方法可以作為花椰菜品種生產 DH 植株參考之用，但因各品種間表現差異大，培養

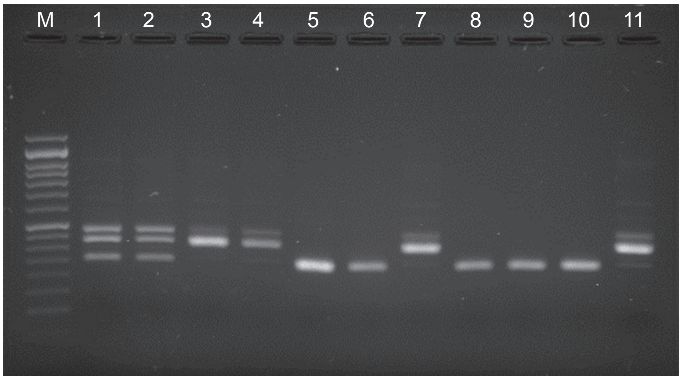


圖 3. 「慶農 S-65」小孢子培養而來之植株以共顯性分子標誌進行聚合酶鏈鎖反應檢測同質結合性。M：100 bp DNA 標準標幟，行 1–2：F_1 植株，行 3–9：雙單倍體植株，行 10–11：單倍體植株。

Fig. 3. Results of polymerase chain reaction using co-dominant marker for heterozygosity detection of microspore-derived plants from cauliflower ‘Chinglong S-65’. M: 100 bp DNA marker, line 1–2: F_1 microspore donor plant, microspore-derived plants, line 3–9: doubled haploid, line 10–11: haploid.

表 7. 花椰菜「慶農 S-65」及「農友極早生」小孢子再生植株以流式細胞儀檢測倍體數之表現。

Table 7. Ploidy level of microspore derived plants from cauliflower ‘Chinglong S-65’ and ‘Known-you Farmers extra early’.

Cultivar	No. of tested plants	% Ploidy level C	2C	4C	Others
Ching Long S-65	16	31.3	56.3	6.2	6.2
Known-you Farmers extra early	17	5.9	58.8	35.3	0.0

條件仍有改善的空間，期望未來小孢子培養技術能更廣泛應用在花椰菜的不同品種，加速育種流程之進行。

引用文獻

Aionesei, T., A. Touraev, and E. Heberle-Bors. 2005. Pathways to microspore embryogenesis. p.11–34. *in*: Biotechnology in Agriculture and Forestry 56-Haploid in Crop Improvement. (Palmer, C. E., W. A. Keller, and K. J. Kasha, eds.) Springer-Verlag. Berlin, Germany. 318 pp.

Chang, Y. M., P. C. Liou, and C. H. Hsiao. 1996. Anther culture of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and broccoli (*B. oleracea* L. var. *italic*) I. Varieties, developmental stages and cultural medium relation with regeneration. J. Agric. Res. China 45:35–46.

Custers, J. B. M. 2003. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). p.185–193. *in*: Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. (Maluszynski, M., K. J. Kasha, B. P. Forster, and I. Szarejko, eds.) Kluwer Acad. Pub. Dordrecht, The Netherlands. 428 pp.

Ferrie, A. 2003. Microspore culture in *Brassica* species. p.205–215. *in*: Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. (Maluszynski, M., K. J. Kasha, B. P. Forster, and I. Szarejko, eds.) Kluwer Acad. Pub. Dordrecht, The Netherlands. 428 pp.

Ferrie, A. M. R., D. C. Taylor, S. L. MacKenzie, and W. A. Keller. 1999. Microspore embryogenesis of high sn-2 erucic acid *Brassica oleracea* germplasm. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 57:79–84.

Ferrie, A. M. R. and K. L. Caswell. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 104:301–309.

Forster, B. P. and W. T. B. Thomas. 2005. Doubled haploids in genetics and plant breeding. Plant Breed Rev. 25:57–88.

Gu, H., X. Sheng, Z. Zhao, H. Yu, and J. Wang. 2014a. Initiation and development of microspore embryogenesis and plant regeneration of *Brassica nigra*. *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant. 50:534–540.

Gu, H., Z. Zhao, X. Sheng, H. Yu, and J. Wang. 2014b. Efficient doubled haploid production in microspore culture of loose-curd cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Euphytica 195:467–475.

Keller, W. A., P. G. Arnison, and B. J. Cardy. 1987. Haploids from gametophytic cells- Recent development and future prospects. p.223–241. *in*: Plant Tissue and Cell Culture. (Green C. E., D. A. Somers, W. P. Hackett, and D. D. Biesboer, eds.) Alan R. Liss, Inc. New York. 599 pp.

Keller, W. A., T. Rajhathy, and J. Lacaopra. 1975. *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*. Can. J. Genet. Cytol. 17:655–666.

Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol. 105:427–434.

Lo, H. L., S. P. Lee, X. P. Chen, D. L. Cai, J. N. Lin, S. T. Wang, K. S. Chen, and Y. W. Yang. 2012. Studies on genetic variation among commercial cultivars and parental lines of cauliflower in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 61:285–297.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiol. Plant. 15:473–497.

Nitsch, C. and J. P. Nitsch. 1967. The induction of flowering in vitro in stem segments of *Plumbago indica* L. I. The production of vegetative buds. Planta 72:355–370.

Smykal, P. 2000. Pollen embryogenesis: The stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. Biol. Plant 43:481–489.

Takahata, Y. and W. A. Keller. 1991. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassic oleracea* L. Plant Sci. 74:235–242.

Thomas, E. and G. Wenzel. 1975. Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. Z. Pflanzenzücht. 74:77–81.

Tinaoana, C. M., Prisecaru, C. Brezeanu, and M. Brezeanu. 2013. Effect of carbohydrate type on the microspore embryogenesis at *Brassica oleracea* L. Romanian Biotechnol. Lett. 18:8677–8684.

Wang, S. T., S. H. Hseu, K. S. Chen, C. C. Chiou, S. P. Li, C. Y. Lin, H. L. Lo, J. N. Lin, M. M. Hsu, and C. F. Hong. 2012. Adjusting breeding strategies of cruciferous vegetable to match challenges of climate change. p.135–152. *in*: Proceedings of the Workshop on Crop Breeding and Management of Agricultural Environment for Coping with Climate Change. Special Publication of TARI, No. 156, Taiwan Agricultural Research Institute. Taichung, Taiwan.

Studies on Microspore Culture of *Brassica oleracea* var. *botrytis* L.

Chi-Ni Hsia[1,*], Uei-Chern Chen[2], Chin-Yi Tsao[3], Yi-Mei Chou[4], and Tzu-Kai Lin[5]

Abstract

Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, Y. M. Chou, and T. K. Lin. 2017. Studies on microspore culture of *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. J. Taiwan Agric. Res. 66(2):94–104.

Brassica oleracea var. botrytis is one of the most important vegetables in the world. However, very few studies on cauliflower microspore culture were conducted in Taiwan. The objective of this study was to establish a microspore culture system- an efficient technique to produce inbred lines for breeding elite F_1 hybrids, starting from cultivar screening for embryogenesis and followed by modifying conditions for germination of microspore-derived embryos. Microspores were inoculated with 4×10^4 microspores mL^{-1} in a NLN-13 medium, then incubated at 32℃ for 1- or 3-day. A total of 8 commercial F_1 hybrids were surveyed. Among them, 'Chinglong S-65' and 'Known-you Farmers extra early' had the highest embryogenesis response. However, there were 3 cultivars were found without any embryo. A multiple factor experiment using two culture media in combination with three duration treatments at 32℃ was further conducted using 'Known-you Farmers extra early'. The effect of 32℃ treated duration, medium salt strength, and their interactions were all significant ($P < 0.01$) on embryogenesis. Among six treatments, 1/2 NLN medium in combination with 1-day culturing at 32℃ had the highest embryogenesis with 12.0 embryos/petri dish. Low germination rates of 2.1% and 4.0% for 'Known-you Farmers extra early' and 'Chinglong S-65' were obtained, respectively, from microspore-derived embryos cultured directly on a hormone-free B5 medium for 4-week. Various types of tissues derived from cotyledonary embryos were subcultured consistently on a BA containing medium for 1-week preculture before on the hormone-free medium for another 5 weeks culturing. Higher shoot germination rates of 66.7% and 86.9% for 'Known-you Farmers extra early' and 'Chinglong S-65' were observed, respectively, from the particular type of explant-elongated hypocotyl tissues with secondary organogenesis. Ploidy level of regenerated plants from 'Known-you Farmers extra early' and 'Chinglong S-65' were analyzed using flow cytometer, and diploid rate of 58.8% and 56.3% were obtained, respectively.

Key words: Cauliflower, Microspore, Doubled haploid.

Received: October 13, 2016; Accepted: March 18, 2016.
[*] Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw
[1] Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[5] Assistant Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

臺灣農業研究66(2) 02-夏奇鈮.indd 104 2017/6/12 下午 08:59:10

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(2):105–112 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06602.03

研究報告

以超高效能液相層析法快速同時定量分析白芷 7 種香豆素成分及美白活性之評估

羅淑卿 [1,*]

摘要

羅淑卿。2017。以超高效能液相層析法快速同時定量分析白芷 7 種香豆素成分及美白活性之評估。台灣農業研究 66(2):105–112。

本研究建立同時分析 7 種香豆素的快速方法，並探討白芷栽種時期各部位之香豆素含量變化和抑制酪胺酸酶活性。超高效能液相層析儀 (UPLC) 使用管柱為 ethylene bridged hybrid (BEH) C_{18}，在酸化水 (pH 3.0) 沖提下，改變氰甲烷 (acetoniltrile) 濃度由 15% 至 95% 使成梯度沖提，可在 12 min 之內，同時有效率的分離並定量香豆素的含量。分析結果顯示，呋喃香豆素，包括 psoralen、xanthotoxin、bergapten 及 8-hydroxybergapte 等成分皆可在種植 9 mo 的白芷根部檢測其含量，其中 8-hydroxybergapten 含量皆高過其他呋喃香豆素 10 餘倍。種植 3 mo 及 6 mo 之白芷莖部抑制酪胺酸酶能力為最佳。高抑制酪胺酸酶之白芷莖部香豆素，未來可進行萃取並應用於化妝品工業。

關鍵詞：白芷美白、香豆素、超高壓液相層析儀。

前言

香豆素被認為是一種植物防禦素 (phytoalexins)，屬植物之防禦物質，亦為植物二級代謝產物，廣泛存於吾人日常飲食中，甚至每天會吃下幾毫克。香豆素普遍存在於雙子葉植物，如繖形花科 (Apiaceae)、菊科 (Asteraceae)、豆科 (Fabaceae)、桑科 (Moraceae)、薔薇科 (Rosaceae)、茜草科 (Rubiaceae)、芸香科 (Rutaceae) 等 (El-Gendy *et al*. 2008)。此些植物如芹菜和香菜，被人類當作香料或蔬菜食用。香豆素具光敏性，在醫學上使用它治療肌膚白斑及乾癬 (psoriasis)，稱為光化學療法 PUVA (psoralen and ultraviolet A)。

白芷為國人使用歷史悠久之中藥材，具美白肌膚的功效。香豆素被認為是白芷主要藥性成分 (Liu *et al*. 2004)。學者指出存在白芷根的多種香豆素，可治療細菌內毒素誘發的炎症 (Kanga *et al*. 2007)、頭痛和普通感冒 (Thanh *et al*. 2004) 及製成抗痙攣藥物 (Choi *et al*. 2005)。

追求白晰的皮膚，為部分黃種膚色人們之希望。而天然來源的美白劑 (lightening agents) 被認為是較安全而無副作用，因此以天然資源為素材之美容保健用品逐漸成為產業趨勢，極具開發潛力 (Kubo *et al*. 1995; Parvez *et al*. 2006)。學者 Piao *et al*. (2004) 指出白芷之美白成分為 8-hydroxybergapten，可抑制酪胺酶活性，美白效能強過坊間常用美白藥劑麴酸約 6 倍。過去白芷只取根部作藥，其他部位以農業廢棄物處置，因此少有資料針對未使用之莖葉部位檢測其藥性成分含量及美白能力。

本研究將建立白芷中較常見香豆素之快速分析方法，並進行不同生長時期各部位之香豆素含量變化及抑制酪胺酶活性之評估，研究結果將有助於白芷有效成分含量分析方法之建

投稿日期：2016 年 5 月 11 日；接受日期：2016 年 7 月 15 日。
[*] 通訊作者：shuchin@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所農業化學組助理研究員。台灣 台中市。

臺灣農業研究66(2) 03-羅淑卿.indd 105 2017/6/12 下午 08:59:30

立、植株選用栽培方法及決定採收時期之重要參考依據。另可開發莖、葉部位之加值利用，期望可提升傳統醫藥產業之應用性。

材料與方法

白芷活性成分之萃取與檢測

由行政院農業委員會農業試驗所農場採集栽種的新鮮白芷 (*Angelica dahurica*)，經 60℃烘乾後磨粉。秤取 1 g 白芷粉末加入 5 mL 乙酸乙酯，以超音波震盪 30 min 後，以 5,000× *g* 離心 10 min，吸上清液到新試管。殘渣再次加入乙酸乙酯萃取，重複上述步驟 2 次後，收集所有上清液。經過濾後，所得濾液於 70℃下進行減壓濃縮去除有機溶劑，再以甲醇回溶定量至 1 mL，以 0.22 µm 過濾膜過濾，分別進行 UPLC 香豆素含量檢測或抑制酪胺酸酶能力測試。標準品購自 Sigma-Aldrich 公司。

UPLC 香豆素含量檢測

香豆素含量分析利用超高效能液相層析儀，機型為 Waters ACQUITYTM UPLC system (Waters Crop, Milford, MA, USA)，分析管柱為 BEH C_{18} column (reverse-phase chromatographic column、150 mm × 2.1 mm, I.D.1.7 µm)、檢出器為光電二極體陣列 eλ 偵測器 (Photodiode Array Detector; PDA)，檢測波長 270 nm，管柱溫度 40℃，採梯度流洗 (gradient elution)。在 0 min 時，移動相為酸化水 (pH 3.0)：氰甲烷 = 85：15 (v/v)，5 min 時移動相為酸化水 (pH 3.0)：氰甲烷 = 60：40 (v/v)，10 min 時移動相為酸化水 (pH 3.0)：氰甲烷 = 70：30 (v/v)，11 min 時移動相為酸化水 (pH 3.0)：氰甲烷 = 5：95 (v/v)，12 min 時移動相為酸化水 (pH 3.0)：氰甲烷 = 85：15 (v/v)，流速皆為 0.25 mL min^{-1}，樣品注射量 5 µL。酸化水之配製以甲酸滴定去離子水至 pH 3.0，再以 0.22 µm (47 mm, FP-200™ Pall Corporation) 膜過濾備用。所有供試樣本和標準品在檢測前，皆以 0.22 µm 過濾膜濾去除雜質。本試驗使用之標準品皆以 100% 甲醇溶解後，再稀釋成適當量以繪製標準檢量線。

白芷乙酸乙酯萃取液對酪胺酸酶活性抑制能力之檢測

美白能力檢測以 Tyrosinase Assay 之方法，參照 Piao *et al*. (2004) 方法稍加修改。溶於甲醇之白芷乙酸乙酯萃取物，以甲醇進行連續稀釋 (0–0.4 g mL^{-1})，再於 80℃水浴蒸乾。加入 10 µL DMSO 溶解後，再加入 190 µL 的去離子水使成 5% DMSO 溶液，混勻後，以 10,000× *g* 離心 3 min。取上清液 40 µL，加入 0.3 mg mL^{-1} tyrosine (溶於 1/15 M phosphate buffer, pH 6.8) 120 µL，混合均勻後，再加 40 µL tyrosinase solution (87.5 units mL^{-1})，測 475 nm 吸光值。再於 37℃反應 30 min，測吸光值。以 5% DMSO 取代檢液當空白組，同上述方法測吸光值，所得數值以下方程式計算酪胺酸酶之抑制能力：

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(A - B) - (C - D) \times 100}{A - B}$$

A：37℃反應後 blank 吸光值
B：37℃反應前 blank 吸光值
C：37℃反應後樣品吸光值
D：37℃反應前樣品吸光值

結果

UPLC 分析條件之確立

白芷根含有多種香豆素成分，為了同時清楚分析出 7 種香豆素化合物，預先以香豆素標準品建立 UPLC 最適分析條件。7 種香豆素標準品配製為 0.625–825 µg mL^{-1} 之濃度，利用氰甲烷及酸化去離子水為移動相，以梯度沖提方式可同時分析及定量單環 (cinnamic acid、ρ-cinnamic acid)、雙環 (umbelliferone) 及三環 (psoralen、xanthotoxin、bergapten 及 8-hydroxybergapten) 之香豆素 (圖 1)。沖提出順序及滯留時間分別為 ρ-cinnamic acid, 3.52 min；umbelliferone, 3.93 min；8-hydroxybergapten, 5.71 min；cinnamic acid, 6.34 min；psoralen, 6.78 min；xanthotoxin, 7.14 min；bergapten, 8.30 min (表 1)。每一香豆素標準品皆可建立良好之線性關係 (R^2 > 0.99) (圖 2)。

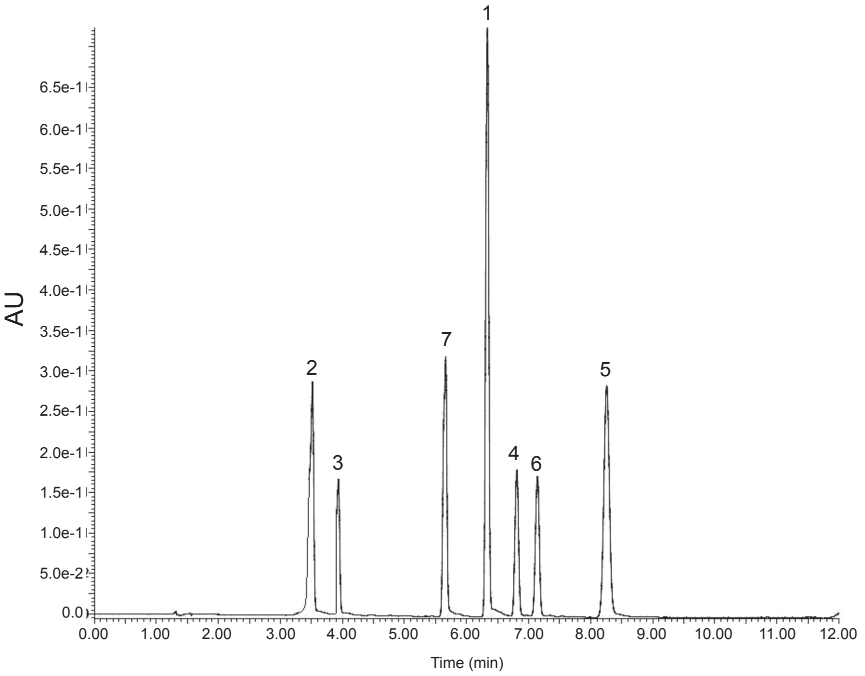


圖 1. 七種香豆素標準品之高效能液相層析圖 (UPLC)。1: cinnamic acid; 2: ρ-cinnamic acid; 3: umbelliferon; 4: porsalen; 5: bergapten; 6: xanthotoxin; 7: 8-hydroxybergapten。

Fig. 1. The chromatograms of ultra performance liquid chromatography (UPLC) of seven authentic coumarins. 1: cinnamic acid; 2: cinnamic acid; 3: umbelliferon; 4: porsalen; 5: bergapten; 6: xanthotoxin; and 7: 8-hydroxybergapten.

表 1. 香豆素迴歸方程式、相關係數及滯留時間之再現性。

Table 1. The reproducibility of regression equation, coefficient of determination and retention time of coumarins.

Item	Regression equation	Coefficient of determination (R^2)	Retention time (min)	Concentration (μg mL^{-1})
Cinnamic acid	y = 81063x + 3689.5	0.9925	6.34	26–413
ρ-Coumaric acid	y = 941.61x − 140.9	0.9999	3.52	28.75–230
Umbelliferon	y = 11565x + 795.66	0.9971	3.93	71.5–825
Porsalen	y = 777393x + 342.27	0.9997	6.78	0.625–50
Bergapten	y = 63119x + 665.23	0.9997	8.30	37.5–600
Xanthotoxin	y = 78291x + 158.44	0.9998	7.14	31.1–337.5
8-Hydroxybergapten	y = 3970.3x + 1458.9	0.9993	5.71	7.8–125

於香豆素標準曲線之線性範圍內，進行同日間 (intra-day) 及異日間 (inter-day) 試驗。配製的標準溶液於不同的 6 d 重覆注射 6 次，每次注射 5 μL，將所得之數據 (retention time 及 peak area) 計算標準偏差 (standard deviation) 與變異係數 (coefficient of variation) (表 1)。7 種香豆素 Intra-day 之滯留時間變異係數 (% CV) 介於 0.5–0.7，而 Inter-day 之滯留時間變異係數介於 0.8–1.9 間，顯示其精確度 (precision) 良好。

白芷不同採收時期各部位之香豆素含量

取白芷不同採收時期 (3、6、9 mo) 各部位 (根、莖、葉) 之乙酸乙酯萃取物，以上述所建立之分析條件探討不同採收時期各部位之香豆素含量。以開發之方法分析白芷萃取物

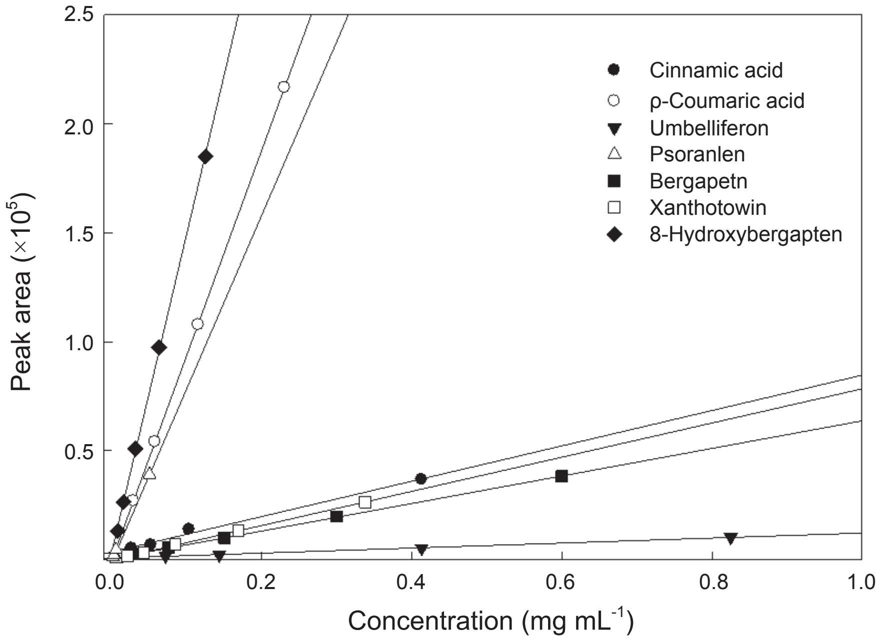


圖 2. 七種香豆素標準品之檢量線。

Fig. 2. Linearity of responses of seven authentic coumarin standards.

時，可在 12 min 內完成。除了 cinnamic acid、cinnamic acid 和 umbelliferone 未能於各生長時期的各部位檢出外，其餘 4 種香豆素 psoralen、xanthotoxin、bergapten 和 8-hydroxybergapten 皆可於白芷植株中檢出。Xanthotoxin、bergapten、8-hydroxybergapten 於多數樣本皆可被大量偵測到，而 psoralen 只能在 9 月採收時期之根部微量 (6 μg g^{-1}) 偵測到 (圖未顯示)。Xanthotoxin 含量以 3 mo 採收期之葉部為最高，達 1.8 mg g^{-1}，之後隨生長時間增加而下降，根、莖的含量很少。Bergapten 含量以 9 mo 採收期之根部含量最高，達 3.1 mg g^{-1}。8-hydroxybergapten 含量皆遠高過 bergapten、xanthotoxin 10 餘倍，其中以種植 3 mo 之莖含量最高，達 33 mg g^{-1} (圖 3)。

白芷不同採收時期各部位抑制酪胺酸酶能力

取白芷不同採收時期 (3、6、9 mo) 各部位 (根、莖、葉) 之乙酸乙酯萃取物，進行抑制酪胺酸酶活性分析試驗。結果顯示，種植 3 及 6 mo 的白芷根及莖部，其抑制酪胺酸酶能力較種植 9 mo 者為佳 (圖 4)。葉部各時期有均等之抑制酪胺酸酶能力。整體而言，以種植 3 mo 及 6 mo 的白芷莖抑制酪胺酸酶能力最佳，其抑制效果達 50% 的濃度 (IC_{50}) 為 8.7 mg mL^{-1}。種植 9 mo 之白芷莖及全時期之葉，其 IC_{50} 約為 150 mg mL^{-1}。種植 9 mo 之根部抑制酪胺酸酶的能力最差，在檢測濃度範圍 400 mg mL^{-1} 內皆無法達 50% 之抑制效果。

討論

本研究成功利用 UPLC 在 12 min 內，完成 7 種結構相近之白芷香豆素之分離及定量。此法改良 Lo *et al*. (2012) 所用方法，以梯度沖提方式來分析香豆素，更具分離單環及雙環之香豆素，如 coumaric acid、psoralen 的效果。本法分析速度快，成本低，產生廢液少，優於目前利用 HPLC 同時分析多種香豆素的方法 (Xie *et al*. 2010; Zheng *et al*. 2010)。本法雖可增快流速，進一步縮短分析時間 (Wu *et al*. 2015)，但因作物萃取物中，非香豆素的它種

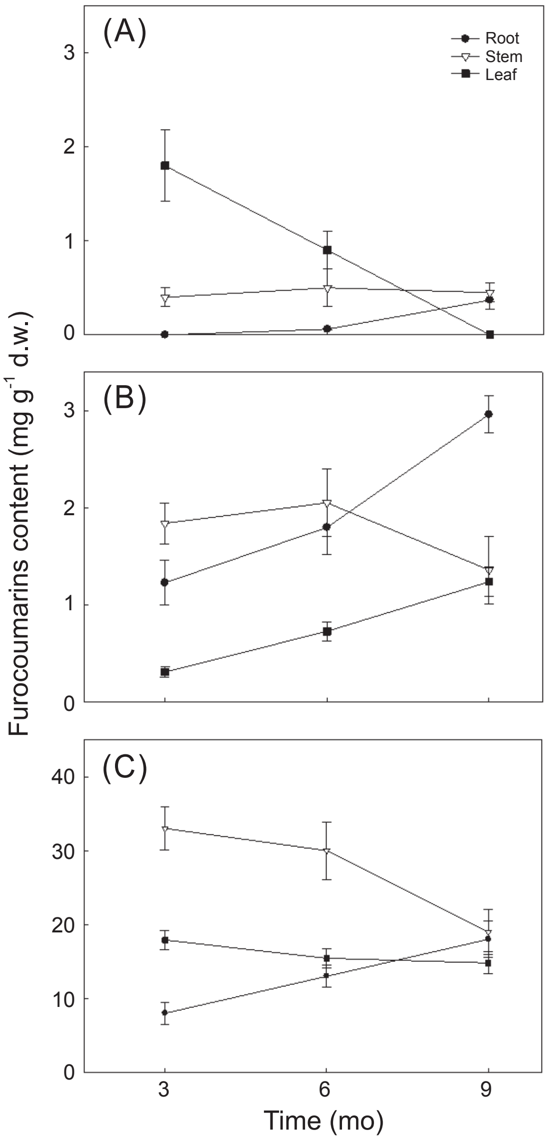


圖 3.　白芷不同生長時期及不同部位之呋喃香豆素含量。(A) Xanthotoxin; (B) Bergapten; (C) 8-Hydroxybergapten. Error bars 係標準差。

Fig. 3.　The furocoumarin contents at different developmental stages and different organs in Bai Zhi. (A) Xanthotoxin; (B) Bergapten; and (C) 8-Hydroxybergapten. The error bars represent SD.

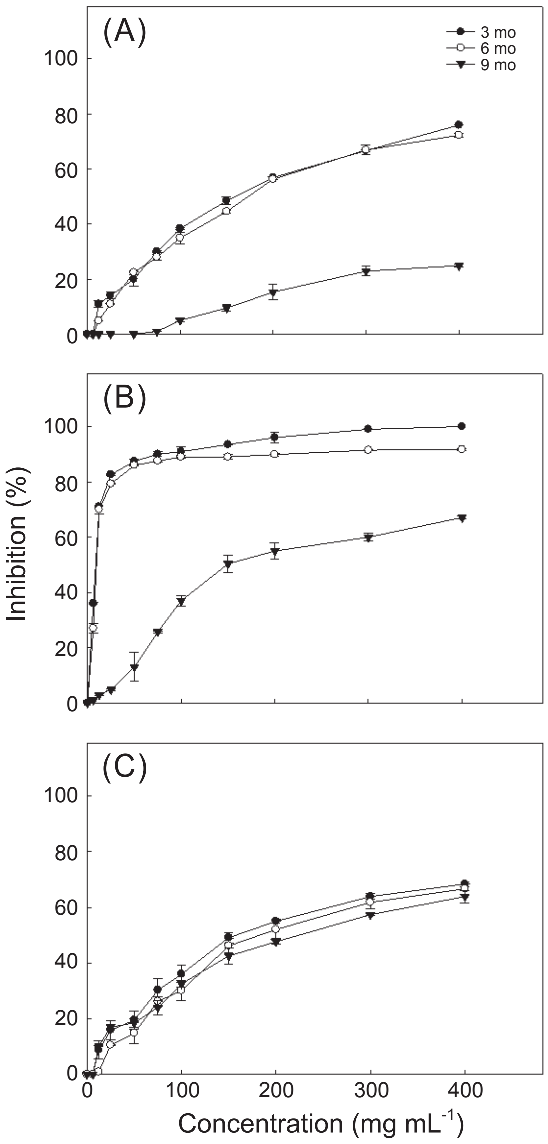


圖 4.　白芷根 (A)、莖 (B)、葉 (C) 不同生長時期對酪胺酸酶抑制率。Error bars 係標準差。

Fig. 4.　Dose-dependent inhibitory effects on mushroom tyrosinase by ethyl acetate extract of root (A), stem (B), and leaf (C) at different developmental stages of Bai Zhi. The error bars represent SD.

成分仍多，為確保只用液相層析儀，即可單離或準確定量本研究的標的香豆素，仍將流速設定為 0.25 mL min^{-1}。本法最後被沖提出的 bergapten 滯留時間為 8.30 min，仍將分析時程延長至 12 min，並於 10–11 min 間，將氰甲烷濃度提高，避免萃取物雜物殘留於管柱中，以利下一個樣本分析。

單環 coumaric acid、cinnamic acid 及雙環之 umbelliferone 未能於只種植 3 mo 的白芷中檢測得，由香豆素合成之代謝路徑可見，此些

成分為代謝路徑較初始之產物。而代謝路徑越末端之呋喃香豆素，包括 psoralen、xanthotoxin、bergapten、8-hydroxybergapten 等含量於越成熟的植株中越高，推測植株中香豆素的累積可能以三環以上為主。香豆素的種類與含量在白芷的每一部位非等量，依文獻指出二級代謝物之分布與累積量差異受外在因素，如種植環境、病蟲害等影響，或內在因素如物種間之差異、植物之生理特性等而影響 (Diawara *et al*. 1995)，因此如此分布不均勻的現象在多種植物皆同。

曾有學者研究芹菜 (*Apium graveolens* L.) 香豆素之分布，發現香豆素含量以成熟之老葉大於根部，和本研究結果不同 (Diawara *et al*. 1995)。白芷根部的 bergapten 量為全株最高，但葉部 bergapten 確實亦隨栽種時間拉長而增加。白芷各部位 bergapten 含量和雪珠花有相似結果 (Ekiert & Gomólka 2000)，學者指出植物之呋喃香豆素功能為保護植物組織，避免被 UV 光傷害並累積於植物體表 (Tietjen *et al*. 1983)。香豆素於各部位生成，但最終會由地上部轉移至植物之貯存器官根部作累積並儲存。芹菜、白芷及雪珠花如此含量差異應歸因於物種之不同，而白芷和雪珠花在分類上同為繖形花科，具有較高之親緣性。

白芷莖部抑制酪胺酸酶能力大過於根部，8-hydroxybergapten 含量亦以莖部最高，顯示美白能力大過於根部，可應用於醫藥美容業。除 8-hydroxybergapten 外，文獻指出許多種類之香豆素，如 scopoletin、esculetin 等 22 種香豆素亦有美白效果 (Masamoto *et al*. 2004)。此外，香豆素 8'-epicleomiscosin 及許多甲氧基取代 (methoxy substitution) 之香豆素如 2-methoxycinnamic acid、3-methoxycinnamic acid 及 4-methoxycinnamic acid 亦有美白能力 (Ahmad *et al*. 2004)，此些物質是否存在白芷莖中，亦對白芷莖美白能力有所貢獻，需進一步分析。而種植 3 mo 之根部抑制酪胺酸酶能力大過於 9 mo，但和 8-hydroxybergapten 含量呈現相反關係。學者指出立體結構與官能基對香豆素之美白能力相當重要，香豆素若受糖基化，抑制酪胺酸酶能力將大幅降低 (Ahmad *et al*. 2004; Masamoto *et al*. 2004)。白芷種植 9 mo 之根部香豆素分子是否受糖基化，才致使美白能力為最低的，需進一步探討。除了香豆素衍生物外，其他如多酚類、flavonoids 亦具酪胺酸酶抑制活性，此些物質通常累積於植株地上部以防止 UV 傷害植株，且廣泛存在於植物體中。因此研判，莖部強大的抑制酪胺酸酶能力，除 8-hydroxybergapten 外，應該還有其他香豆素及防 UV 物質所貢獻。

白芷美白機制和廣泛應用於醫學美容業之麴酸相同，為非競爭性抑制酪胺酸酶。雖然本研究白芷莖部萃取物美白能力不及麴酸 (IC_{50} = 12.8 μg mL^{-1})，但透過進一步的純化萃取技術可以克服此缺點 (Piao *et al*. 2004)。以 UPLC 分析白芷各器官之香豆素含量時，發現莖或葉的 UPLC 圖譜相較於根部少波峰，顯示兩部位組成分單純，且質地無粉質，若要進行有效成分萃取，較根部容易。另外，許多昆蟲 (如果蠅) 在成蟲時，骨骼硬化過程亦需酪胺酸酶，白芷莖對酪胺酸酶高效抑制能力未來也可用於農業上之蟲害防治 (Kubo *et al*. 2003)。

開發快速、簡易且一次即可同時定量多種藥性成分之分析方法，可快速掌控進口原料及出廠成品的品質。追蹤中草藥種植期間重要成分之變化亦可當作農藝專家改進栽培技術之改進參考。

本研究以氰甲烷混合酸化去離子水為移動相之梯度沖提方式，可同時分析和定量單環、雙環及三環等 7 種香豆素化合物，利用此分析方法確認 4 種香豆素 psoralen、xanthotoxin、bergapten、8-hydroxybergapten 皆可於白芷根部中發現。白芷地上部莖及葉以往皆視為農業廢棄物，其高效之抑制酪胺酸酶能力，未來可加值利用。透過萃取技術去蕪存菁，純化的美白成分可成為醫學美容產品之原料並作多項應用。

誌謝

本研究報告承行政院農業委員會農業試驗所李雅琳博士協助校稿得以完成本文，特申謝忱。

引用文獻

Ahmad, V. U., F. Ullah, J. Hussain, U. Farooq, M. Zubair, M. T. Khan, and M. I. Choudhary. 2004. Tyrosinase inhibitors from *Rhododendron collettianum* and their structure-activity relationship (SAR) studies. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 52:1458–1461.

Choi, S. Y., E. M. Ahn, M. C. Song, D. W. Kim, J. H. Kang, O. S. Kwon, T. C. Kang, and N. I. Baek. 2005. *In vitro* GABA-transaminase inhibitory compounds from the root of *Angelica dahurica*. Phytother. Res. 19:839–845.

Diawara, M. M., J. T. Trumble, F. C. Quiros, and R. Hansen. 1995. Implications of distribution of lnear furanocoumarins within celery. J. Agric. Food Chem. 43:723–727.

Ekiert, H. and E. Gomólka. 2000. Coumarin compounds in *Ammi majus* L. callus cultures. Pharmazie 55:684–687.

El-Gendy, M. M., M. Shaaban, A. M. El-Bondkly, and K. A. Shaaban. 2008. Bioactive benzopyrone derivatives from new recombinant fusant of marine streptomyces. Appl. Biochem. Biotechnol. 150:85–96.

Kanga, O. H., G. H. Lee, H. J. Choi, P. S. Park, H. S. Chae, S. I. Jeong, Y. C. Kim, D. H. Sohn, H. Park, J. H. Lee, and D. Y. Kwon. 2007. Ethyl acetate extract from *Angelicae Dahuricae Radix* inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E2 and tumor necrosis factor-via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-KappaB in macrophages. Pharmacol. Res. 55:263–270.

Kubo, I., I. Kinst-Hori, K. Nihei, F. Soria, M. Takasaki, J. S. Calderón, and C. L. Céspedes. 2003. Tyrosinase inhibitors from galls of *Rhus javanica* leaves and their effects on insects. Z. Naturforsch. C. 58C:719–725.

Kubo, I., Y. Yokokawa, and I. Kinst-Hori. 1995. Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants. J. Nat. Prod. 58:739–743.

Liu, R., A. Li, and A. Sun. 2004. Preparative isolation and purification of coumarins from *Angelica dahurica (Fisch. ex Hoffm) Benth, et Hook. f* (Chinese traditional medicinal herb) by high-speed counter-current chromatography. J. Chromatogr. A.1052:223–227.

Lo, S. C., P. E. Chung, and C. S. Wang. 2012. Molecular cloning and functional analysis of bergaptol-O-methyltransferase from Angelica dahurica (Bai Zhi) and using it to efficiently produce bergapten in *E. coli*. Bot. Stud. 53:197–206.

Masamoto, Y., Y. Murata, K. Baba, Y. Shimoishi, M. Tada, and K. Takahata. 2004. Inhibitory effects of esculetin on melanin biosynthesis. Biol. Pharm. Bull. 27:422–425.

Parvez, S., M. Kang, H. S. Chung, C. Cho, M. C. Hong, M. K. Shin, and H. Bae. 2006. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. Phytother. Res. 20:921–934.

Piao, X. L., S. H. Baek, M. K. Park, and J. H. Park. 2004. Tyrosinase-inhibitory furanocoumarin from *Angelica dahurica*. Biol. Pharm. Bull. 27:1144–1146.

Thanh, P. N., W. T. Jin, G. Song, K. Bae, and S. S. Kang. 2004. Cytotoxic coumarins from the root of *Angelica dahurica*. Arch. Pharm. Res. 27:1211–1215.

Tietjen, K. G., D. Hunkler, and U. Matern. 1983. Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. 1. Identification of induced products as coumarin derivatives. Eur. J. Biochem. 131:401–407.

Wu, Y., F. Wang, Y. Ai, W. Ma, Q. Bian, D. Y. W. Lee, and R. Dai. 2015. Simultaneous determination of seven coumarins by UPLC-MS/MS: Application to a comparative pharmacokinetic study in normal and arthritic rats after oral administration of Huo Luo Xiao Ling Dan or single-herb extract. J. Chromatogr. B. 991:108–117.

Xie, Y., W. Zhao, T. Zhou, G. Fan, and Y. Wu. 2010. An efficient strategy based on MAE, HPLC-DAD-ESI-MS/MS and 2D-prep-HPLC-DAD for the rapid extraction, separation, identification and purification of five active coumarin components from Radix Angelicae Dahuricae. Phytochem. Anal. 21:473–482.

Zheng, X., X. Zhang, X. Sheng, Z. Yuan, W. Yang, Q. Wang, and L. Zhang. 2010. Simultaneous characterization and quantitation of 11 coumarins in Radix Angelicae Dahuricae by high performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 51:599–605.

Simultaneous Quantification of Seven Coumarins in *Angelica dahurica* (Bai Zhi) Using Ultra Performance Liquid Chromatography and Its Whitening Efficiency Assessment

Shu-Chin Lo[1,*]

Abstract

Lo, S. C. 2017. Simultaneous quantification of seven coumarins in *Angelica dahurica* (Bai Zhi) using ultra performance liquid chromatography and its whitening efficiency assessment. J. Taiwan Agric. Res. 66(2):105–112.

An improved ultra performance liquid chromatography method was developed to simultaneously quantify seven coumarins isolated from various organs of Bai Zhi [*Angelica dahurica* (Fish.) BENTH. *et* HOOK]. An efficient separation and quantification of coumarin can be established within 12 min using ethylene bridged hybrid (BEH) C_{18} column and a gradient elution system with a acetonitrile concentrations varying from 15 to 95% (v/v) in acidic water (pH 3.0) elution. The furanocoumarins such as psoralen, xanthotoxin, bergapten, and 8-hydroxybergapten were detected in 9 month-old Bai Zhi roots, in which the content of 8-hydroxybergapten was 10-fold higher than other coumarins. Nevertheless, stems from 3 and 6 month-old Bai Zhi exhibited the highest inhibitory ability on tyrosinase activity. In the future, coumarins extracted from the stems of Bai Zhi with high inhibitory effect on tyrosinase could be further used in the cosmetic industry.

Key words: *Angelica dahurica* whitening efficiency, Coumarins, Ultra-performance liquid chromatography.

Received: May 11, 2016; Accepted: July 15, 2016.

* Corresponding author, e-mail: shuchin@tari.gov.tw

1 Assistant Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

臺灣農業研究66(2) 03-羅淑卿.indd 112 2017/6/12 下午 08:59:31

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(2):113–125 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06602.04
研究報告

焙炒處理對胡麻機能性成分之影響

黃榮清[1] 左先正[1] 初建[2] 李雅琳[3,*]

摘要

黃榮清、左先正、初建、李雅琳。2017。焙炒處理對胡麻機能性成分之影響。台灣農業研究 66(2):113–125。

胡麻 (*Sesamum indicum*) 為台灣重要油料作物之一。「台南一號」胡麻 (‘Tainan No. 1’) 於 1992 年育成，擁有優良農藝特性，為目前主要的栽培品種，主要產地在台南市地區。一般胡麻在食用前會先經過焙炒，包括榨油之前的前處理，然而各家業者的焙炒條件不同。本研究探討焙炒條件對胡麻機能性成分之影響，期能提供業者合適的建議。採集栽種於台南地區 22 處農戶的「台南一號」胡麻種子，使用含水率最低 (4.3%) 及最高之胡麻 (8.7%) 種子，以不同溫度 (120、140、160℃) 及時間 (10、15、20 min) 進行焙炒後，再以甲醇或乙醚 (不同極性) 進行機能性成分萃取，探討不同條件下其總酚含量、還原力、生育醇之變化。結果顯示，隨焙炒強度的提升，總酚含量與還原力也隨之上升。其中，140℃焙炒 10 min 的胡麻籽兼具良好之風味與相對較高的機能性成分；其乙醚萃取之生育醇含量可達 570 mg L^{-1}，高出過去國內外研究報告中的胡麻品種含量。

關鍵詞：胡麻、焙炒、機能性成分、生育酚、酚類化合物。

前言

胡麻 (Sesame, *Sesamum indicum*) 是胡麻科胡麻屬植物，別名有芝麻、脂麻、油麻，為一年生草本植物，原產於東印度，經由西域傳入中國。目前，胡麻多生產於熱帶及亞熱帶地區，全球主要產地為印度、緬甸、中國、奈及利亞等地區，因應當地需求與環境，已有許多不同的改良品種產生。台灣關務署統計，2014 年進口胡麻總量為 46,313 Mg，總金額達 7,063 萬美元，出口金額為 126 萬美元；胡麻油及含其餾分物進口金額為 333 萬美元，出口金額為 2,646 萬美元，合計入超 4,624 萬美元 (合台幣 13 億 8 千 7 百萬元)。農糧署調查 2014 年台灣生產胡麻總產量為 2,207 Mg，僅占進口量的 4.8%，顯示胡麻的國產量缺口相當大，實有提高國產胡麻產量的必要性。

胡麻被歸類為國際重要作物，其種子為人類重要的營養來源之一，所以已經建立許多營養學上的背景知識 (Namiki 2007; Kanu *et al*. 2010)：種子平均油脂含量 50% 以上，富含不飽和脂肪酸，主要的兩種不飽和脂肪酸是油酸 (30–63% oleic acid, C18:1) 及亞油酸 (46–58% linoleic acid, C18:2)；蛋白質含量約占 17–32%，含有豐富含硫胺基酸，以甲硫胺酸 (methionine，人體必需胺基酸) 及半胱胺酸 (cysteine) 為主，營養優於一般植物性蛋白質；碳水化合物占 3.4–13.6%，主要為葡萄糖及果糖，不含澱粉；粗纖維含量 2.81–7.23%；礦物質含量高於米、麥、大豆及其他乾果類種子，其中尤以鈣質含量最多，每 100 g 胡麻籽約含鈣 1,200 mg、鐵 9.6 mg、磷 540 mg；含有豐富的重要水溶性維生素，包括 B1、B2 及菸鹼酸等，在 100 g 種子中含量分別為 1.5 mg、0.25 mg 及 6.0 mg。

投稿日期：2015 年 11 月 17 日；接受日期：2016 年 7 月 26 日。
[*] 通訊作者：ylleet@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。
[2] 農委會藥物毒物試驗所殘毒管制組副研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所生物技術組副研究員。台灣 台中市。

生長於熱帶及亞熱帶的胡麻，種子油脂以不飽和脂肪酸為主 (> 85%)，因為必須對抗環境的高氧化壓力，已知含有高量的油溶性維生素 E、木酚素等天然抗氧化劑。目前文獻報告其維生素 E 含量最高者為 533 mg L^{-1} (Blatt *et al*. 2001)，主要為 α-tocopherol (50–373 mg L^{-1}) 及 γ-tocopherol (90–390 mg L^{-1}) 兩種結構。東南亞地區包含台灣、韓國與日本生產的胡麻，其維生素 E 是以 γ-tocopherol 結構為主，含量介於 100–440 mg L^{-1}，並且因品種與栽培條件不同而使含量有相當大的差異。日本學者 (Pior *et al*. 1991; Kuriyama *et al*. 1995) 對胡麻的抗氧化物質進行深入研究，發現胡麻種子中含有豐富的酚類化合物 (phenols)，屬於木酚素 (lignin)，並命名為 sesamin、sesamolin、sesamolinol、sesaminol 及 sesamol 等，具有良好的抗氧化能力。現代科學已經瞭解，人體老化與癌症發生的重要起因是「氧化傷害」(Cutler *et al*. 2004; Valko *et al*. 2006)，所以攝取能提高人體抗氧化能力的食物，成為重要的抗癌、延緩老化策略。

台灣位處熱帶與亞熱帶交界處，氣候適合胡麻生長，主要座落於嘉南平原，普遍種植「台南一號」(‘Tainan No. 1’) 品種。此品種是由行政院農業委員會台南區農業改良場李文輝先生於 1996 年育成，屬中熟品種，莖桿粗壯，抗倒伏，種皮黑色，已被許多學者用於與各國胡麻品系成分比較，具有高的油脂、sesamin、sesamolin 及 γ-tocopherol 含量。「台南一號」過去已有些基礎研究報告，例如其春、秋二產季的產量差異 (春作 1,217 kg ha^{-1}，秋作 941 kg ha^{-1}) (Lee 1996)、油脂含量 52–56%、香氣組成分 (Lee & Liu 2011)。

胡麻的常見食用方法，是經過焙炒後直接攝取，或者再經壓榨作為食用油。過去研究報告 (Hsieh *et al*. 2014) 顯示，隨著焙炒溫度越高，其酚類化合物含量越高，抗氧化能力越強。然而，隨著冷壓橄欖油的風行，市場亦出現不經過加熱的冷壓胡麻油產品，並且訴求其生理活性高於傳統榨油法。根據行政院農業委員會農糧署統計，103 年度全台胡麻主要栽植地為台南市，其產量占總產量的 97.6%。本研究為釐清焙炒對胡麻的影響，以及研究台灣自行育成的品種「台南一號」，特地收蒐集台南市地區生產的胡麻樣品作為試驗材料，處理不同的焙炒條件，再以甲醇或乙醚萃取胡麻籽的機能性成分並加以分析，以期找到較合適的焙炒條件提供產業製程之建議。

材料與方法

胡麻籽採樣與含水量分析

台灣台南市地區 22 處農戶於 2014 年秋季栽培生產的胡麻籽樣品，分別編號整理列表 (表 1)。含水率依循 CNS 8315-N 4079「油籽水分及揮發物含量之測定方法」，以鋁箔紙壓模成小燒杯形狀於 105℃烘箱乾燥至恆重，紀錄重量 (W1)。取約 2 g 胡麻樣品，放入鋁箔杯後，精確秤重 (含杯重 W2)，置入 105℃烘箱乾燥，每 2 h 取出置於乾燥器冷卻後秤重，直至 2 次秤重間差異等於或少於 0.005 g 為止，記錄重量 (W3)。含水率 (%) = (W2 − W3) ÷ (W2 − W1) × 100%。

胡麻籽焙炒處理與溶劑萃取

分別取 100 g 胡麻，以 120、140 及 160℃三種溫度，加熱 10、15 或 20 min 進行焙炒 (自動烘焙機，ET-2，易淳企業有限公司，台灣)，自然冷卻後置於 -20℃冰箱冷藏備用。使用時，取出胡麻放置於室溫回溫後，再以研缽磨成細粉，秤取約 0.1 g，分別加入甲醇或乙醚 0.3 mL，靜置 2 min，以 12,000× *g* 離心 2 min 後取出澄清液，重複萃取 4 次，匯集萃取液以減壓濃縮法去除有機溶劑 (離心式真空濃縮乾燥機，SPD111V，Thermo，U.S.A.) 後，秤重，記錄萃取量，油脂樣品置於 -20℃貯藏以供後續各種分析試驗使用。

脂肪酸組成分析

秤取約 0.014 g 之油脂樣品 (乙醚萃取法) 至 2 mL 塑膠離心管中，加入 1,000 μL 正己烷 (含內標準品 3.0 mg mL^{-1} methyl heptadecanoate, C17:0-CH_3, Sigma Aldrich, U.S.A.)。 加入 60 μL 2 N KOH (配製於甲醇中)，震盪 10 min。加入 400 μL 飽和食鹽溶液，均勻混合

臺灣農業研究66(2) 04-李雅琳.indd 114 2017/6/14 下午 04:31:05

表 1. 台灣台南之胡麻樣品採集地點。

Table 1. Collection spots of sesame samples in Tainan, southern Taiwan.

Sample no.	WC (%)[z]	Sampling site with global positioning system (GPS)
S1	4.63 ± 0.07	N: 23°06'45.36" E: 120°09'32.35"
S2	4.84 ± 0.01	N: 23°07'12.34" E: 120°08'57.02"
S3	4.27 ± 0.01	N: 23°11'36.64" E: 120°10'10.75"
S4	4.64 ± 0.03	N: 23°13'00.34" E: 120°08'20.59"
S5	5.33 ± 0.04	N: 23°12'57.24" E: 120°09'48.05"
S6	7.45 ± 0.07	N: 23°07'40.45" E: 120°12'59.70"
S7	7.40 ± 0.01	N: 23°07'48.60" E: 120°13'30.71"
S8	6.03 ± 0.02	N: 23°07'45.07" E: 120°13'43.85"
S9	5.51 ± 0.03	N: 23°07'58.70" E: 120°13'45.72"
S10	8.69 ± 0.02	N: 23°08'09.53" E: 120°13'46.23"
S11	7.43 ± 0.02	N: 23°13'00.34" E: 120°08'20.59"
S12	4.27 ± 0.03	N: 23°12'57.24" E: 120°09'48.05"
S13	5.68 ± 0.04	N: 23°06'42.37" E: 120°18'51.87"
S14	5.57 ± 0.07	N: 23°06'03.50" E: 120°18'03.86"
S15	6.12 ± 0.01	N: 23°06'13.39" E: 120°17'41.77"
S16	6.30 ± 0.06	N: 23°07'21.19" E: 120°17'9.57"
S17	6.45 ± 0.05	N: 23°08'17.94" E: 120°17'32.22"
S18	4.65 ± 0.04	N: 23°08'58.37" E: 120°17'17.70"
S19	6.04 ± 0.10	N: 23°05'58.98" E: 120°12'48.78"
S20	5.75 ± 0.02	N: 23°06'10.28" E: 120°12'39.62"
S21	5.87 ± 0.04	N: 23°06'52.85" E: 120°13'34.01"
S22	5.08 ± 0.01	N: 23°07'39.99" E: 120°14'34.98"

[z] Water content.

以終止反應後，12,000× *g* 離心 2 min，使溶液分層 (上層為正己烷層，下層為甲醇層)。取出之上層液以 0.45 µm 過濾膜 (PVDF filter, Millex-HV, Millipore, Darmstadt, Germany) 進行過濾後 10× 稀釋，定容至總體積 1,000 µL。使用氣相層析串聯質譜儀 (GC-MS, 3800 GC/MS, Varian, U.S.A.)，分析 1.0 µL 樣品，注射口溫度 (injector temperature) 為 275℃，分離管柱採用毛細管柱 CP8822 (Vf-23ms 30 m, 0.25 mm, ID DF = 0.25, Varian, U.S.A.)，載送氣體 (carrier gas) 為 99.99% 高純氦氣 (He)，流速為 0.9 mL min^{-1}；溫度設定：起始溫度 100℃，持溫 1 min 後，再以 15℃ min^{-1} 之速率升溫，由 100℃上升至 185℃，之後持溫 8 min。

胡麻籽萃取物總酚含量分析

標準曲線以蒸餾水 (ddH_2O) 稀釋沒食子酸 (gallic acid, Sigma Aldrich, U.S.A.)，分別取 10 µL 之 0、0.2、0.4、0.6、0.8 及 1 mg mL^{-1} gallic acid，依序加入 ddH_2O 160 µL，Folin-Ciocalteau phenol reagent (Sigma Aldrich, U.S.A.) 10 µL，35% Na_2CO_3 (Sigma Aldrich, U.S.A.) 20 µL，最終體積 200 µL 混合均勻，測 OD750 值。樣品是胡麻焙炒、磨碎後以甲醇 (簡寫為 MeOH) 或乙醚 (簡寫 Et_2O) 萃取去除溶劑後之油脂 (以下分析樣品皆同)，以 MeOH 溶劑稀釋 10× 取 15 µL，依序加入 ddH_2O 240 µL，Folin-Ciocalteau phenol reagent 15 µL，35% Na_2CO_3 30 µL，充分混合均勻，離心 13,000× *g* 2 min，盡量避免沾到

浮在液面上的油脂或先去除浮油，取 200 µL 反應液加到 ELISA 反應盤，以 ELISA Reader (SpectraMax 250, Molecular device, U.S.A.) 偵測 OD750 吸光值。

胡麻籽萃取物還原力分析

油脂樣品以 MeOH 10× 稀釋，取 100 µL–1.5 mL 微量離心管，加入 100 µL 0.2 M 磷酸緩衝液，混合均勻後，加入 100 µL 1% $K_3Fe(CN)_6$，混合均勻。置於 50℃乾浴槽 20 min 後插入冰上，使之冷卻 (約 30 s)，快速離心後，加入 100 µL 10% trichloroacetic acid (TCA , Sigma Aldrich, U.S.A.) 混合均勻，離心 13,000× *g* 2 min 後，取 100 µL 反應液至 ELISA 反應盤中，加入 80 µL ddH_2O 後，再加入 20 µL 0.1% $FeCl_3$ 混勻，立即放入 ELISA Reader 測定 OD700 吸光值。每樣品 3 重複。

標準曲線是以 MeOH 配製 trolox (Sigma Aldrich, U.S.A.) 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 及 1.2 mM，反應步驟和樣品測定方法相同。

胡麻籽萃取物生育醇分析

樣品製備是取甲醇與乙醚萃取的胡麻油脂 10 µL，加入 190 µL 正己烷 (稀釋 20×)，以 0.45 µm 過濾膜 (PVDF filter，同上) 進行過濾。標準曲線是配製 50、100 及 150 mg mL^{-1} γ-tocopherol 標準品。以高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, 2695, Waters, Milford, MA) 進行分析，分離管柱為 Inertsil ODS-3 (5 µm, 150 mm × 4.6 mm I.D., GL Sciences, Japan)，溫度 40℃，移動相為 MeOH：ACN = 40：60 (ACN 為 acetonitrile, Sigma Aldrich, U.S.A.)；流速設定為 1 mL min^{-1}，使用螢光偵測器 (Waters 2475 multi λ fluorescence detector) 分析，激發波長 298 nm，放射波長 328 nm。

胡麻籽萃取物之 ABTS 自由基清除能力分析

反應試劑為 2,2’-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS, Calbiochem, U.S.A.) 與 30 mM ammonium persulfate (Bio-Rad, U.S.A) 以 10：1 之比例於實驗分析前 2 h 混合並放置於黑暗處，以產生穩定的陽離子自由基。反應試劑以約 5× ddH_2O 稀釋，使其波長 734 nm 吸光值落於 1.0–1.5 之間，是為 ABTS 反應試劑。如分析樣品具備清除此自由基的能力，將使 OD734 吸光值降低。其油脂樣品以 10× 體積 MeOH 混合均勻，取混合液 25 µL–1.5 mL 微量離心管，加入 225 µL ABTS 反應試劑，混合均勻後，離心 13,000× *g* 2 min，取 200 µL 下層反應液至 ELISA 反應盤中，立即放入 ELISA Reader 測定 OD734 數值。每樣品 3 重複。

標準曲線是以 MeOH 配製 trolox 0、0.2、0.4、0.6 及 0.8 mM，反應步驟和樣品測定方法相同。

胡麻籽萃取物之 DPPH 自由基清除能力分析

油脂樣品以異丙醇稀釋 3×，取 90 µL–1.5 mL 微量離心管，加入 810 µL 穩定自由基溶液 100 µM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma Aldrich, U.S.A)，混合均勻後，離心 13,000× *g* 2 min，取 200 µL 反應液至 ELISA 反應盤中，立即放入 ELISA Reader 測定 OD517 吸光值。每樣品 3 重複。若分析樣品具有清除 DPPH 自由基能力，將使 OD517 吸光值降低。

標準曲線是以 MeOH 配製 L-ascorbic acid (Sigma Aldrich, U.S.A) 0、0.02、0.04、0.06、0.08 及 0.1 mg mL^{-1}，反應步驟和樣品測定方法相同。

結果

胡麻樣品含水量差異與不同焙炒條件

於台南地區採集 22 位不同農戶栽培生產之胡麻 (表 1) (分別編號 S1–S22)，其製程是採收後各農戶於當地日曬乾燥，再收集回到試驗室分析其水分含量。結果顯示，22 個胡麻樣品含水量差異相當大 (4.27–8.69%) (表 1)，平均值為 5.82%。Yen *et al*. (1986) 發表乾燥胡麻之含水量為 4.88%，與本試驗結果相近，然而有部分胡麻樣品含水量高達 8% 以上，可能歸因於胡麻栽培環境、田間管理，乃至於日曬乾燥條件不同所造成。含水量不同可能代表胡

麻籽的機能性成分亦有差異，因此我們選用含水率最低的 S3 (4.27 ± 0.07%) 與最高的 S10 (8.69 ± 0.02%)，作為後續試驗材料。胡麻焙炒處理分別以 120、140 及 160℃加熱 10、15 或 20 min。焙炒冷卻後，每個樣品約取用 2 g 進行官能品評，發現不論 S3 或 S10 樣品，以 120℃焙炒的胡麻仍帶有草腥味，而 160℃焙炒的樣品，全部出現焦臭味，唯有 140℃焙炒的樣品味道合宜適口，其中，以加熱 10 min 者呈現最佳風味。

胡麻焙炒後之油脂萃取率與其脂肪酸組成分析

不同焙炒條件處理 (溫度 120–140℃、10–20 min) 的胡麻樣品 S3 與 S10，其甲醇萃取油脂之平均萃取率分別為 41.9% ± 1.2% 及 39.2% ± 1.8% (圖 1A)，乙醚則為 56.2% ± 1.4%、54.2% ± 1.5%；乙醚之萃取量高出甲醇 15%；而不同焙炒條件之處理，對油脂萃取率之影響差異不大。另外，S3 的油脂萃出率略高於 S10 胡麻樣品約 2%。進一步分析乙醚萃取油脂中的脂肪酸組成 (圖 1B)，顯示 S3 與 S10 十分相近，脂肪酸組成平均值：C16:0 為 7.29% ± 0.20%、C18:0為5.79% ± 0.50%、C18:1為39.23% ± 0.56%、C18:2為47.70% ± 0.82%、C18:3為1.00% ± 0.03%。Yen *et al*. (1986) 使用「台南一號」胡麻，不經焙炒直接碾碎，使用正己烷萃取胡麻中的油脂，其產率 (52.7%) 及脂肪酸組成與本試驗結果 (表 2、圖 1B) 相近，顯示乙醚與正己烷對於油脂均具有良好的溶解力，而甲醇之萃取率僅 40%。

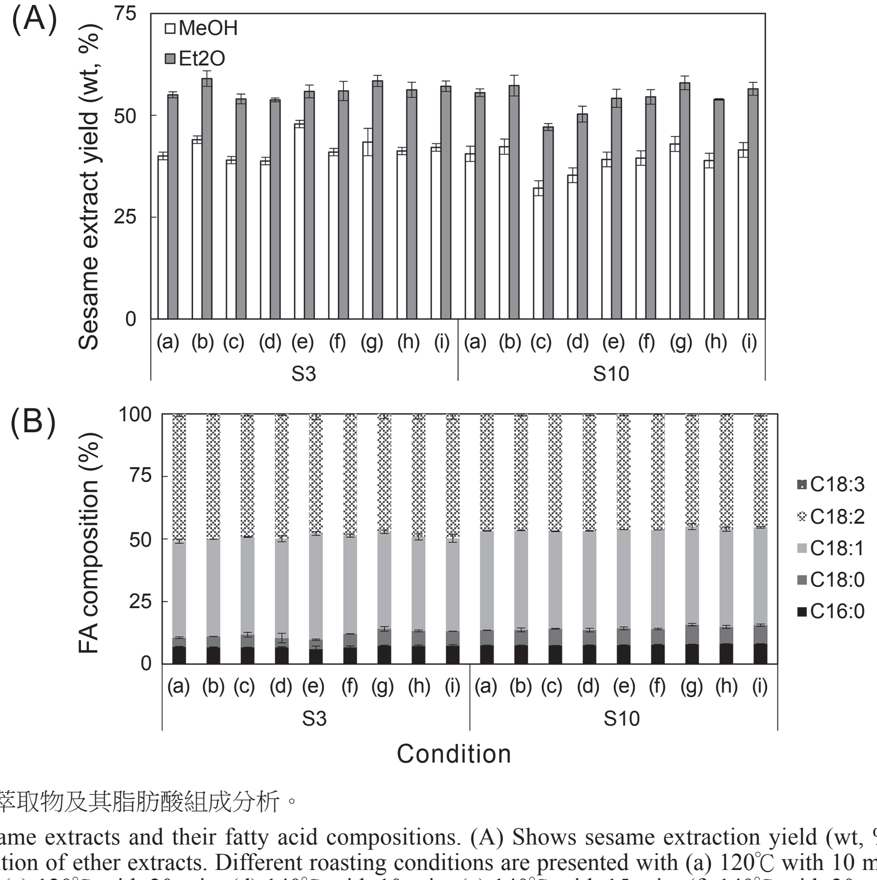


圖 1. 胡麻萃取物及其脂肪酸組成分析。

Fig. 1. Sesame extracts and their fatty acid compositions. (A) Shows sesame extraction yield (wt, %); (B) Fatty acid-composition of ether extracts. Different roasting conditions are presented with (a) 120℃ with 10 min, (b) 120℃ with 15 min, (c) 120℃ with 20 min, (d) 140℃ with 10 min, (e) 140℃ with 15 min, (f) 140℃ with 20 min, (g) 160℃ with 10 min, (h) 160℃ with 15 min, and (i) 160℃ with 20 min. "MeOH" and "Et_2O" represent extractions from methanol and diethyl ether, respectively. Bars show mean ± standard deviation (*n* = 2).

表 **2.** 胡麻低及高含水量之種子萃取物組成分分析。

Table 2. Ingredients analyses of sesame extracts[z] of low and high water contents.

Sesame sample	Water content (%)	Extraction solvent	Oil content (%)	Phenols[y] (mg mL^{-1})	Reducing power[x] (mM)	*γ*-Tocopherol[w] content (mg L^{-1})
S3	4.27 ± 0.01	Methanol	41.9 ± 1.2	0.82 ± 0.04	6.08 ± 0.25	259.2 ± 10.3
		Diethyl ether	56.2 ± 1.4	0.48 ± 0.03	1.85 ± 0.05	487.5 ± 14.7
S10	8.69 ± 0.02	Methanol	39.2 ± 1.8	0.81 ± 0.03	6.38 ± 0.17	140.6 ± 7.6
		Diethyl ether	54.2 ± 1.5	0.44 ± 0.03	1.96 ± 0.05	455.8 ± 17.4

[z] Average values of all sesame samples treated with different roasting conditions.
[y] Standard curve was established with gallic acid.
[x] Standard curve was established with Trolox.
[w] Main tocopherol form found in the assayed sesame samples.

胡麻油脂之總酚含量與還原力分析

甲醇 (圖 2A)、乙醚 (圖 2B) 萃取油脂之總酚含量分析顯示，兩者均隨著焙炒強度提高 (溫度提高、時間加長) 而增加，兩者最高值落於 160℃焙炒條件下 (10–20 min 時間差異不大)，甲醇萃取者 S3 與 S10 樣品分別為 1.24 ± 0.07、1.24 ± 0.05 mg mL^{-1}，乙醚萃取者分別為 0.80 ± 0.03、0.68 ± 0.03 mg mL^{-1}，均呈現高於 120℃焙炒條件下總酚含量的 2–3 倍。與前人研究結果相符合 (Elleuch *et al*. 2007)，高溫處理會使胡麻酚類化合物的含量提高。此外，甲醇萃取油脂的平均總酚含量為 0.82 ± 0.04 mg mL^{-1}，約 2 倍高於乙醚萃取者 0.46 ± 0.03 mg mL^{-1} (表 2)。

圖 3A、3B 分別呈現甲醇與乙醚萃取油脂之還原力，其中，甲醇萃取者隨著焙炒條件的加劇而增加，與其酚類化合物含量變化有相近趨勢，S3 與 S10 之最高還原力分別為 10.64 ± 0.72、10.97 ± 0.56 mM，出現於 160℃焙炒 20 min 之條件，約達最低焙炒強度者的 5 倍。然而乙醚萃取者的還原力變化，受焙炒強度之影響較低，雖然 S3 與 S10 最高者 2.34 ± 0.10、2.59 ± 0.08 mg mL^{-1} 同樣出現在最高焙炒強度 (160℃加熱 20 min)，但是僅為最低焙炒強度者約 1.5 倍。計算不同焙炒強度下的油脂平均還原力 (表 2)，S3 樣品以甲醇與乙醚萃取者分別是 6.08 ± 0.25、1.85 ± 0.05 mM，S10 樣品則是 6.38 ± 0.17、1.96 ± 0.05 mM，顯示甲醇萃取物的還原力為乙醚萃取物的 3 倍以上。

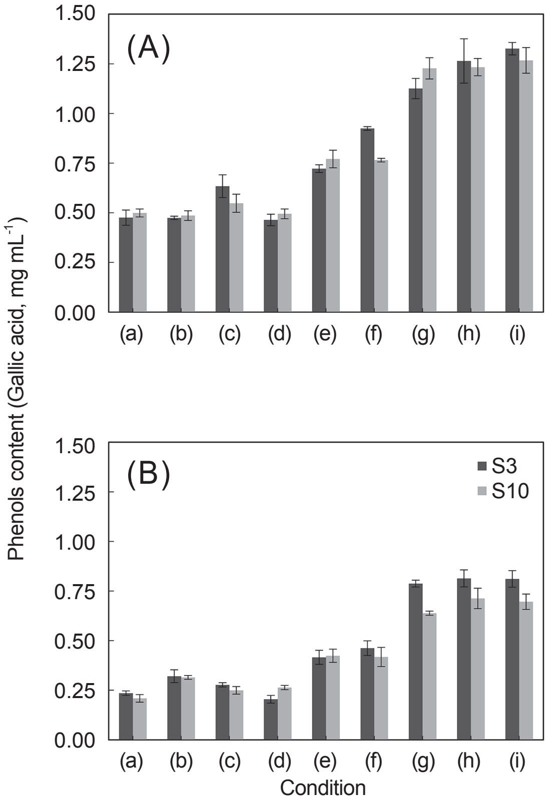


圖 2. 不同焙炒條件之胡麻甲醇、乙醚萃取油脂總酚含量分析。

Fig. 2. Phenols content of different roasting conditions of sesame seeds extracted with methanol (A) or ether (B). Different roasting conditions were (a) 120℃ with 10 min, (b) 120℃ with 15 min, (c) 120℃ with 20 min, (d) 140℃ with 10 min, (e) 140℃ with 15 min, (f) 140℃ with 20 min, (g) 160℃ with 10 min, (h) 160℃ with 15 min, and (i) 160℃ with 20 min. Bars show mean ± standard deviation (*n* = 3).

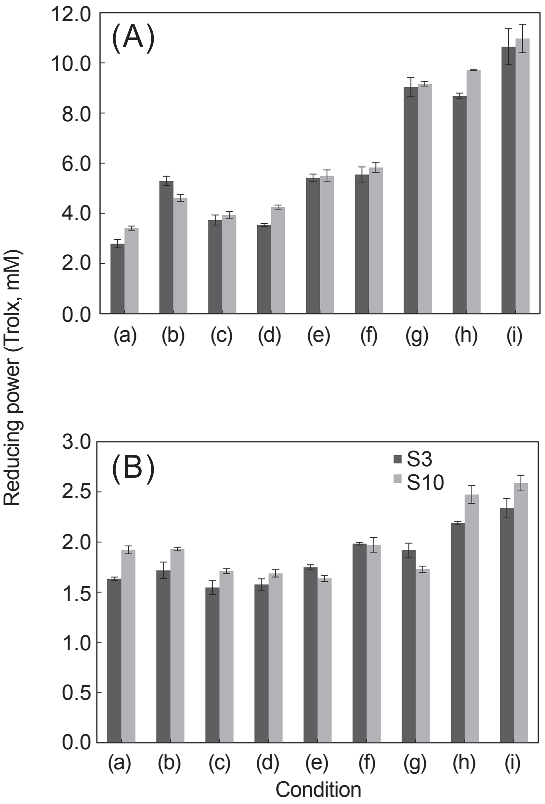


圖 3. 不同焙炒條件之胡麻甲醇、乙醚萃取油脂還原力分析。

Fig. 3. Reducing power of different roasting conditions of sesame seeds extracted with methanol (A) or ether (B). Different roasting conditions were (a) 120℃ with 10 min, (b) 120℃ with 15 min, (c) 120℃ with 20 min, (d) 140℃ with 10 min, (e) 140℃ with 15 min, (f) 140℃ with 20 min, (g) 160℃ with 10 min, (h) 160℃ with 15 min, and (i) 160℃ with 20 min. Bars show mean ± standard deviation (n = 3).

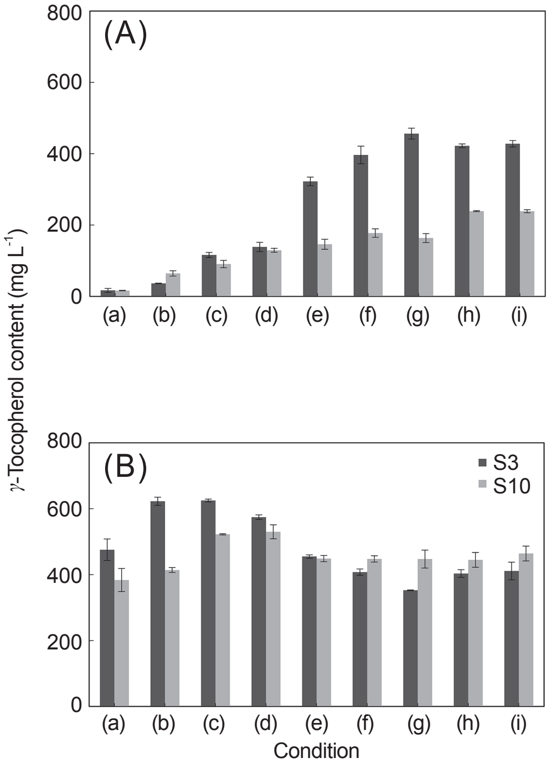


圖 4. 不同焙炒條件之胡麻甲醇、乙醚萃取油脂 γ-生育酚含量分析。

Fig. 4. γ-Tocopherol content of different roasting conditions of sesame seeds extracted with methanol (A) or ether (B). Different roasting conditions were (a) 120℃ with 10 min, (b) 120℃ with 15 min, (c) 120℃ with 20 min, (d) 140℃ with 10 min, (e) 140℃ with 15 min, (f) 140℃ with 20 min, (g) 160℃ with 10 min, (h) 160℃ with 15 min, and (i) 160℃ with 20 min. Bars show mean ± standard deviation (n = 2).

胡麻萃取油脂之維生素 E 含量

HPLC 分析維生素 E 組成，甲醇與乙醚萃取油脂 (圖 4) 中均僅出現 γ 型，無 α、β、δ 型，甲醇萃取物的含量隨著焙炒強度增加而上升，至最強焙炒強度而達到最高點，含水量低的樣品 S3 及高的樣品 S10，數值分別從 16.9 ± 1.9 mg L^{-1} 上升至 427.9 ± 15.4 mg L^{-1}，以及 16.2 ± 0.7 mg L^{-1} 增加至 238.8 ± 1.5 mg L^{-1}。乙醚萃取物之 γ-tocopherol 隨著焙炒強度上升，呈現先增後降的情形，S3 樣品最高點出現於 120℃焙炒 20 min，數值為 625.0 ± 4.2 mg L^{-1}，S10 樣品則出現於 140℃焙炒 10 min，數值為 529.9 ± 21.2 mg L^{-1}；乙醚之萃取效果明顯高於甲醇，且低含水率的種子 (S3) 含量高於高含水量的種子 (S10)。

胡麻油脂之 ABTS 與 DPPH 自由基清除能力分析

因為胡麻以 140℃焙炒 10 min 具有較佳的風味，所以使用 S3、S10 胡麻種子以此條件焙炒後，重新製備一批壓榨油脂，並且使用保健食品常用的穩定自由基產生試劑 ABTS 及 DPPH，試驗油脂樣品清除自由基的能力，結果顯示於圖 5A (ABTS)、圖 5B (DPPH)。

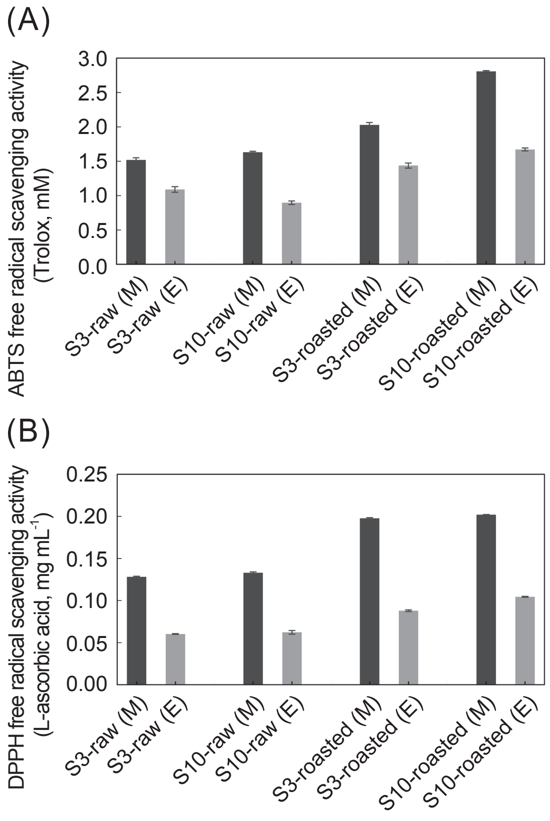


圖 5. 胡麻樣品 S3 及 S10 不經處理或以 140℃焙炒 10 分鐘之壓榨油捕捉 ABTS (A) 及 DPPH (B) 自由基之能力。

Fig. 5. ABTS (A) and DPPH (B) free radicals scavenging activities of sesame oils expressed from S3 and S10 raw materials or roasted (at 140℃ for 10 min). Black columns are oil samples extracted with methanol (M) or grey columns ether (E). The data were calculated from triplicated samples. Bars show mean ± standard deviation (n = 3).

針對 ABTS 自由基捕捉能力，S3 與 S10 胡麻焙炒處理的壓榨油樣品，不論是以甲醇萃取 (分別為 2.03 ± 0.03、2.81 ± 0.01 mM) 或乙醚萃取 (分別為 1.44 ± 0.04、1.67 ± 0.02 mM)，其自由基清除能力均高於未炒焙者 (甲醇萃取者：分別為 1.52 ± 0.03、1.63 ± 0.01 mM；乙醚萃取者：分別為 1.09 ± 0.04、0.90 ± 0.03 mM)；S3 炒焙處理是未炒焙處理的 1.3 倍，而 S10 在炒焙後則高於未炒焙者約 1.8 倍。為比較不同溶劑萃取效果，分別計算 S3 與 S10 未炒焙以及炒焙 (140℃、10 min) 樣品油脂的平均 ABTS 自由基清除能力 (表 3)，S3 樣品以甲醇與乙醚萃取者分別是 1.77 ± 0.25、1.26 ± 0.17 mM，S10 樣品則是 2.22 ± 0.59、1.28 ± 0.39 mM，顯示甲醇萃取物的 ABTS 自由基清除能力為乙醚萃取物的 1.4 倍。

針對 DPPH 自由基清除能力，S3 與 S10 胡麻焙炒處理的壓榨油樣品，其趨勢與 ABTS 相同，不論是以甲醇 (分別為 0.198 ± 0.001、0.202 ± 0.000 mg L^{-1}) 或乙醚萃取 (分別為 0.088 ± 0.001、0.104 ± 0.001 mg L^{-1})，其自由基清除能力亦均高於未炒焙者 (甲醇萃取者：分別為 0.128 ± 0.001、0.133 ± 0.001 mg L^{-1}；乙醚萃取者：分別為 0.060 ± 0.000、0.062 ± 0.002 mg L^{-1})；S3 焙炒處理是未焙炒處理者的 1.5 倍，而 S10 在炒焙後則高於未炒焙者約 1.6 倍。比較不同溶劑萃取效果，S3 與 S10 未焙炒以及焙炒 (140℃、10 min) 樣品油脂的平均 DPPH 自由基清除能力 (表 3)，S3 樣品以甲醇與乙醚萃取者分別是 0.163 ± 0.049、0.074 ± 0.020 mg L-1 (表 3)，S10 樣品則是 0.168 ± 0.049、0.083 ± 0.030 mg L^{-1}，顯示甲醇萃取物的 DPPH 自由基清除能力為乙醚萃取物的 2 倍。

討論

甲醇與乙醚溶劑萃取胡麻機能性成分之效果比較

甲醇與乙醚的物化特性不同，表 4 整理二者之介電常數 (dielectric constant)、沸點 (boiling point)、表面張力 (surface tension)、黏度 (viscosity)、偶極矩 (dipole moment)、時間加權平均閾值 (threshold limit value-time weighted average，縮寫為 TLV-TWA，是針對有害物質，美國政府工業衛生師協會制訂的一種閾值，定義工作每日 8 h 或每週 40 h 中，允許曝露於環境空氣中此有害物質平均濃度限定值) 等數值。甲醇親水、沸點與黏度較高，乙醚反之，所以二者萃取出胡麻中的成分具有親水或疏水之不同傾向。萃取胡麻的維生素 E，在所有的焙炒條件下，乙醚的萃出量均高於甲醇，再以平均萃取量比較，乙醚的萃出量約高於甲醇 2 倍；針對平均萃油率，乙醚亦高於

表 3. 胡麻種子不經處理或以 140℃焙炒 10 min 樣品之不同溶劑萃取液捕捉自由基能力。

Table 3. Comparison of free radicals scavenging activities of different solvents extraction with sesame seeds from both raw and roasted (140℃ for 10 min) materials.

Sesame sample	Extraction solvent	ABTS radicals[z] (mM)	DPPH radicals[y] (mg mL^{-1})
S3	Methanol	1.77 ± 0.25[x]	0.163 ± 0.049
	Diethyl ether	1.26 ± 0.17	0.074 ± 0.020
S10	Methanol	2.22 ± 0.59	0.168 ± 0.049
	Diethyl ether	1.28 ± 0.39	0.083 ± 0.030

[z] Standard curve was established with trolox.
[y] Standard curve was established with L-ascorbic acid.
[x] Average value ± standard deviation is calculated from the data of raw and roasted seeds.

表 4. 甲醇與乙醚之物理化學特性。

Table 4. Physiochemical characteristics of used solvents methanol and ether.

Solvent	Dielectric constant	BP (℃)	Surface tension (dyne cm^{-1})	Viscosity (cPoise)	Dipole moment	TLV-TWA[z] (mg L^{-1})
Methanol	31.2	64.7	22.6	0.59	1.7	200
Ether	4.3	34.6	16.5	0.22	1.2	400

[z] TLV-TWA: threshold limit value-time weighted average, average exposure on the basis of a 8 h d^{-1}, or 40 h wk^{-1} work schedule. It means that workers who exposing to the chemical below the basis day after day shall be safe for a working lifetime without adverse health effects.

甲醇萃取者 1.3 倍。依據這些觀察，再加上乙醚的安全性 (TLV-TWA 400 mg L^{-1}) 高於甲醇 (TLV-TWA 200 mg L^{-1})，乙醚應該更適於作為胡麻機能性成分的萃取溶劑。然而，甲醇萃出的酚類化合物，以及還原力卻分別高出乙醚萃取者 2 倍與 3 倍之多。進一步比較無焙炒或經過 140℃焙炒 10 min 的胡麻樣品榨出油脂，甲醇萃取物在 ABTS 與 DPPH 自由基清除能力中，也分別高出乙醚 1.4 倍及 2 倍，此結果說明胡麻樣品中具有抗氧化能力的物質，屬於相對親水的特性，並且隨著焙炒條件增強，這些成分也隨之增加，同時，酚類化合物含量與兩者 (焙炒強度與抗氧化能力) 呈現正相關。此結果相同於我們過去研究苦茶籽油的抗氧化功效，與苦茶籽焙炒強度呈現正相關 (Hsieh *et al*. 2014)。

Elleuch *et al*. (2007) 的報告中，顯示胡麻的酚類化合物主要包含木酚素、黃酮類 (原花青素、兒茶素)、酚酸 (綠原酸、阿魏酸、香豆酸、咖啡酸)、二苯基乙烯 (白藜蘆醇) 等等。其中，芝麻素 (sesamin) 是最重要主要木酚素。Mahendra Kumar & Singh (2015) 的研究報告中指出，胡麻在高溫焙炒過程中，芝麻素會因熱裂解為芝麻酚 (sesamol)，而芝麻酚的抗氧化能力高於胡麻油中其他相似結構的分子，成為胡麻油最重要的抗氧化能力來源。芝麻酚溶於甲醇，以及混溶於油脂之中，是屬於極性較高的分子。隨著焙炒溫度提升，榨出油的酚類化合物含量、還原力 (抗氧化能力) 上升，特別可以觀察甲醇萃取者，發現焙炒條件 140℃、10 min 與 15 min 是分界點，前者與 120℃焙炒者酚類化合物含量以及還原力屬於同一群，其後，則酚類化合物含量與還原力逐漸上升，故推測140℃焙炒時間超過10 min後，芝麻素可能開始裂解產生芝麻酚。

生育酚 (維生素 E) 亦屬於酚類化合物，由平均萃取量觀察，乙醚的萃取效果高出甲醇 2–3 倍，顯示其化學特性偏向非極性分子。在甲醇萃取油脂中，生育酚的含量隨者焙炒條件的增強逐漸上升，特別是 S3 胡麻籽，在 140℃、15 min 焙炒者是 10 min 焙炒者的 2 倍，與前述焙炒條件 140℃、10 min 與 15 min 之間，符合芝麻素裂解產生芝麻酚的臨界點推論，推測因為增加的芝麻酚分子 (其疏水端) 與生育酚交互作用，導致甲醇萃取物在 140℃、15 min 焙炒強度以上的生育酚含量顯

著增加，直到 160℃焙炒條件後持平。然而，在乙醚萃取物中的生育酚，隨著焙炒強度增加而先升後降，特別在高溫 (160℃) 的焙炒條件下明顯降低，推測可能因為溫度過高而導致部分 γ-tocopherol 被破壞。

一般咸認植化素中的維生素 E 是極重要的抗氧化分子，然而本實驗結果顯示，較高生育酚含量的乙醚萃取物，其抗氧化能力 (還原力) 反而低於甲醇萃取物，此結果顯示維生素 E 之外的植化素對於抗氧化功效的貢獻更為重要。Dai *et al*. (2008) 研究顯示，維生素 E 雖為對抗油脂氧化反應的第一線關鍵分子，但與之共存的其他親水性抗氧化物，例如維生素 C 與茶多酚等分子，可以有效地還原被氧化的維生素 E，使整體抗氧化能力上升。胡麻的親水性抗氧化物質主要有 sesaminol triglucoside (Kuriyama *et al*. 1995; Shyu & Huang 2002) 與黃酮花色苷素 (anthocyanin) (Zhang *et al*. 1998; Long *et al*. 1999) 兩類，而後者是花青素 (anthocyanidin) 與醣分子以糖苷鍵結合的化合物；此二類分子均為帶有醣基的水溶性分子，故此推測甲醇萃取物的高還原力，除了因為高溫焙炒使芝麻素裂解產生的芝麻酚，主要亦由此二類抗氧化物質提供。如此，解釋了甲醇萃取油脂中雖然 γ-tocopherol 含量較乙醚萃取者低，但總酚含量與還原力較高的現象。此外，胡麻中含有高量的單醣 (3.4–13.6% 葡萄糖與果糖)，強力焙炒條件下，胡麻可能因組織崩解而使單醣與 sesaminol、anthocyanin 接觸，並且在高溫下脫水衍生更多 sesaminol triglucoside 與 anthocyanidin 相關的化合物，因其疏水端特性相同於芝麻酚的疏水端，亦可與維生素 E (γ-tocopherol) 產生交互作用。故推測使甲醇對高溫焙炒條件下生育酚的萃取率提高，是因為高溫下出現更多同時具有親水與疏水端的分子產生共萃取效應所導致。然而，對於 S3 與 S10 兩種不同含水率的樣品，使用甲醇萃取的效果，在高溫焙炒條件下，前者高於後者 2 倍，則需要進一步深入探討方能有解答。

建議合宜之胡麻焙炒條件

相同胡麻品種的油脂品質與其機能性成分，受到種植環境、田間管理、採收、乾燥、焙炒等條件影響。本試驗中，台南市地區 22 家農戶生產的胡麻中，最高與最低含水量就具有 2 倍差異，經過焙炒後，胡麻籽的色澤與香氣也略有不同，值得深入分析。此焙炒處理，可使胡麻籽實散發濃郁香氣，可能是發生食品化學中常見的梅納反應、醣胺基反應、焦糖化反應等 (Pokorny 1980; Nakamura *et al*. 1989)，然而，焙炒的時間過長或溫度過高，均可能降低胡麻 (油) 的品質。過去研究 (Evans *et al*. 1974; Yen 1990; Yoshida 1994; Yoshida & Kajimoto 1994; Yoshida & Takagi 1997) 指出，適當焙炒胡麻可以提升胡麻油脂的品質，Xu & Yan (1987) 則根據其研究結果，推測胡麻未經焙炒步驟，壓榨出的胡麻油中存在的微量酵素 (例如脂肪酶、脂氧合酶、過氧化酶等) 未失活性，導致隨貯放時間增加，其游離脂肪酸、過氧化物含量亦增加；另外，胡麻適度焙炒產生的梅納反應 (Maillard reaction，醣胺基反應) 產物，亦可能是焙炒過的胡麻萃取油脂中，使捕捉自由基能力提高的原因之一 (Amarowicz 2009)。例如，咖啡豆烘焙過程的梅納反應產物，在體外試驗觀察到可以降低人類低密度脂蛋白的氧化情形 (Sacchetti *et al*. 2009)。對「台南一號」胡麻籽進行不同條件焙炒後，初步的官能品評顯示 120℃/10–20 min，胡麻籽具有草腥味；140℃/10 min 的胡麻籽風味最佳，而其所壓榨的胡麻油，則具清香味，且不同於市售胡麻油的濃厚香氣；140℃/15–20 min 與 160℃/10–20 min 焙炒條件下胡麻皆具焦苦味，所壓榨之油脂氣味與市售胡麻油相似，160℃/10–20 min 則香味則過於濃烈。Takeda *et al*. (2008) 的研究結果建議胡麻於 230℃焙炒 5–15 min 時，香氣可達最佳狀態；Yoshida & Kajimoto (1994) 則建議胡麻籽以 200℃焙炒 30 min，能獲得香味品質最佳之胡麻油。本試驗結果與過去研究有差異，可能與胡麻品種，及或過去僅分析榨出油脂的品評，並未直接測試胡麻籽風味有關。此外，芝麻素裂解產生的芝麻酚是否對胡麻籽的風味造成影響，未來可以進一步深入研究。

此外，針對機能成分的變化分析，「台南

一號」胡麻經過焙炒處理，除了以乙醚萃取胡麻 γ-tocopherol 時，其含量在 160℃焙炒溫度下含量略降，其餘機能性成分或功效分析結果 (酚類化合物、還原力與 γ-tocopherol) 皆會隨著溫度而上升，與前人研究相符。此外，Huang & Hu (2006) 對台灣、韓國與日本等地生產的胡麻進行抗氧化物質含量比較，結果顯示未經焙炒處理的胡麻籽，「台南一號」含較高量的 sesamin、sesamolin、γ-tocopherol 與 sesaminol triglucoside 等抗氧化物質，而在本實驗中，「台南一號」胡麻以最佳風味的焙炒條件 140℃/10 min 處理，S3、S10 種子以乙醚萃取之胡麻油脂中，分別含有 574、530 mg L^{-1} γ-tocopherol，高於 Huang & Hu (2006) 報告所萃取之 γ-tocopherol 約兩倍以上 (240 mg L^{-1}，平均春秋產季)。此外，由捕捉自由基能力，包括 ABTS、DPPH 兩種自由基，140℃焙炒 10 min 的胡麻籽萃取物都高於不經焙炒的樣品，顯示焙炒處理可以顯著提高抗氧化能力。

綜合上述所論，建議「台南一號」胡麻可以 140℃焙炒 10 min，其產製的胡麻籽滋味甘甜、具胡麻清香，並且同時具相當高的機能性成分以及較高的氧化安定性。至於要壓榨製成胡麻油的焙炒條件，則可以適度再提高其焙炒強度，產製更高機能性成分含量的油脂，本研究的最高焙炒溫度 160℃，時間 10、15 及 20 min，均有較高的酚類化合物及抗氧化能力，而榨出之油脂胡麻香氣濃郁，建議當以壓榨油為目的時可以選擇這些焙炒條件。另外，胡麻機能性成分研究中，多使用單一溶劑萃取物進行成分比較，這是由於胡麻被認為主要成分為油脂，因此多使用非極性溶劑正己烷，本研究則以兩種不同極性的溶劑進行萃取試驗，發現「台南一號」胡麻中的極性分子具有高還原力，是過去較被忽略的機能性成分，未來可進一步深入探討其組成分並加以利用。

誌謝

感謝行政院農業委員會提供 104AS-18.3.1-CI-C1 研究計畫的經費支持，使本研究可以順利執行與完成。

引用文獻

Amarowicz, R. 2009. Antioxidant activity of Maillard reaction products. Eur. J. Lipid Sci. Tech. 111:109–111.

Blatt, D. H., S. W. Leonard, and M. G. Traber. 2001. Vitamin E kinetics and the function of tocopherol regulatory proteins. Nutrition 17:799–805.

Cutler, R. G., J. Kelly, K. Storie, W. A. Pedersen, A. Tammara, K. Hatanpaa, J. C. Troncoso, and M. P. Mattson. 2004. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. P. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:2070–2075.

Dai, F., W. Chen, and B. Zhou. 2008. Antioxidant synergism of green tea polyphenols with α-tocopherol and L-ascorbic acid in SDS micelles. Biochimie 90:1499–1505.

Elleuch, M., S. Besbes, O. Roiseux, C. Blecker, and H. Attia. 2007. Quality characteristics of sesame seeds and by-products. Food Chem. 103:641–650.

Evans, C., G. List, R. Beal, and L. Black. 1974. Iron and phosphorus contents of soybean oil from normal and damaged beans. J. Amer. Oil Chem. Soc. 51:444–448.

Hsieh, C., J. Yang, D. Chen, Y. Chuang, C. Wang, and Y. Lee. 2014. Effects of roasting *Camellia tenuifolia* seeds with/without shells on the quality of seed oil. J. Taiwan Agric. Res. 63:17–29.

Huang, S. F. and T. K. Hu. 2006. Variation in antioxidants of sesame seed as affected by accessions and cropping seasons. J. Agric. For. 55:97–110.

Kanu, P. J., J. Z. Bahsoon, J. B. Kanu, and J. B. Kandeh. 2010. Nutraceutical importance of sesame seed and oil: A review of the contribution of their lignans. Biomed. Res. 2:4–16.

Kuriyama, K., K. Tsuchiya, and T. Murui. 1995. Generation of new lignan glucosides during germination of sesame seeds. J. Agric. Chem. Soc. Jpn. 69:685–693. (in Japanese with English abstract)

Lee, C. H. 2011. Effect of Temperature and Time on Agronomic Characters and Major Volatiles of Sesame (*Sesamum indicum* L.). Master Thesis, Department of Agronomy, National Chiayi University. Chiayi, Taiwan. 104 pp. (in Chinese with English abstract)

Lee, W. H. 1996. A New Sesame Variety Tainan No. 1. Tainan Special Publ. Tainan Agriculture Experimental Station Press, Tainan, Taiwan. 99 pp. (in Chinese)

Long, S. J., G. R. Nong, and W. L. Ma. 1999. Inhibitory effects of pigment and polysaccharide from black Sesame on chemiluminescence in whole blood and active oxygen. Sci. Tech. Food Ind. 20:7–10.

Mahendra Kumar, C. and S. A. Singh. 2015. Bioactive lignans from sesame (*Sesamum indicum* L.): Evaluation of their antioxidant and antibacterial effects for food applications. J. Food Sci. Tech. 52:2934–2941.

Nakamura, S., O. Nishimur, H. Masuda, and S. Mihara. 1989. Identification of volatile flavor components of the oil from roasted sesame seeds. Agric. Biol. Chem. 53:1891–1899.

Namiki, M. 2007. Nutraceutical functions of sesame: A review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 47:651–673.

Prior, E. M., V. S. Vadke, and F. W. Sosulski. 1991. Effect of heat treatments on canola press oils. I. Non- triglyceride components. J. Amer. Oil Chem. Soc. 68: 401–406.

Pokorny, J. 1980. Effect of substrates on changes of fats and oils during frying. Riv. Ital. Sostanze. Gr. 57:222–225.

Sacchetti, G., C. Di Mattia, P. Pittia, and D. Mastrocola. 2009. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. J. Food Eng. 90:74–80.

Shyu, Y. and L. S. Hwang. 2002. Antioxidative activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted Burma black sesame meal. Food Res. Intl. 35:357–365.

Takeda, Y., H. Hashimoto, H. Imai, H. Aoyama, A. Ise and N. Ishizuka. 2008. Odor-active components in ground roasted sesame seeds. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 55:383–388. (in Japanese)

Valko, M., C. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. Chem. Biol. Interact. 160:1–40.

Xu, X. 1987. Studies on Improvement of the Processing and Quality of Sesame Oil. Master Thesis, Institute of Food Science and Technology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 117 pp. (in Chinese with English abstract)

Yen, G. C., S. L. Shyu, and J. S. Lin. 1986. Studies on protein and oil compositions of sesame. J. Agric. For. Natl. Chung Hsing Univ. 35:177–186. (in Chinese with English abstract)

Yen, G. C. 1990. Influence of seed roasting process on the changes in composition and quality of sesame (*Sesame indicum*) oil. J. Sci. Food Agric. 50:563–570.

Yoshida, H. and G. Kajimoto. 1994. Microwave heating affects composition and oxidative stability of sesame (*Sesamum indicum*) oil. J. Food Sci. 59:613–616.

Yoshida, H. and S. Takagi. 1997. Effects of seed roasting temperature and time on the quality characteristics of sesame (*Sesamum indicum*) oil. J. Sci. Food Agric. 75:19–26.

Zhang, M. W., L. Sun, J. W. Chi, L. Z. Lai, and Z. J. Wang. 1998. Comparative study on natural pigments in black rice, black soy bean and black sesame. J. Chinese Cereals Oils Ass. 13:6–9. (in Chinese with English abstract)

Effects of Roasting Conditions on the Functional Components of Sesame

Rong-Cing Huang[1], Hsien-Cheng Tso[1], Chien Chu[2], and Ya-Lin Lee[3,*]

Abstract

Huang, R. C., H. C. Tso, C. Chu, and Y. L. Lee. 2017. Effects of roasting conditions on the functional components of sesame. J. Taiwan Agric. Res. 66(2):113–125.

Sesame (*Sesamum indicum*) is an important oil crop in Taiwan. 'Tainan No. 1' sesame with superior agricultural traits is a dominant cultivar domestically, which was bred in 1992 and has been cultivated over the Tainan area. Roasting is a common treatment of sesame cuisine, including when used as materials for oil manufacturing. At present, roasting conditions vary according to the flavor required. This study aimed at revealing the effects of roasting treatments on functional components of the sesame seeds in order to provide suggestions for processing industry. Sesame samples of 'Tainan No. 1' were collected from twenty-two farm fields (or farmers), and the lowest water content (4.3%) and the highest one (8.7%) were employed for this purpose. Roasting conditions at temperature 120, 140 or 160℃ with time period 10, 15 or 20 min were conducted. Methanol or diethyl ether (with different polarities) was used as solvent to extract the active ingredients of these treated sesame seeds, and phenolics, reducing power and tocopherol content were determined. Results showed that phenolics and reducing power increased with the increasing of roasting intensities. Among them, the sesame seeds roasted at 140℃ for 10 min exhibited the best flavor and comparatively high active components, in which the tocopherol content reaching 570 mg L^{-1}, higher than ever reported sesame cultivars of both domestic and foreign breeds.

Key words: Sesame, Roasting, Functional components, Tocopherol, Phenolics.

Received: November 17, 2015; Accepted: July 26, 2016.
* Corresponding author, e-mail: ylleet@tari.gov.tw
1 Research Assistants, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Associate Research Fellow, Residue Control Division, Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(2):126–133 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06602.05 研究報告

採收前水分管理對椪柑果實貯藏中品質變化之影響

唐佳惠 [1,*]

摘要

唐佳惠。2017。採收前水分管理對椪柑果實貯藏中品質變化之影響。台灣農業研究 66(2):126–133。

為探討採收前斷水處理對椪柑貯藏期間果實品質指標值變化之影響，供試植株分別於採收前 56、28、14、7 及 3 d 施行斷水處理。根據試驗結果，採前 7 d 才斷水者，其果實於貯藏 1 mo 後即開始顯現果肉乾粒化，較其他斷水期限者早。從癒傷結束至貯藏 1 mo 時，取樣自採收前 56 d 即斷水植株之果實，其果汁率高於其他斷水期限。2005 年供試植株不論斷水期限為何，其果實貯藏 1 mo 時，可溶性固形物含量均較癒傷結束時略增，之後再逐漸降低，但 2006 年則無先增後降之情形。果實貯藏期間的可溶性固形物含量，有植株斷水越遲者下降越快的趨勢。2 供試年期之果實，貯藏至採收後 3 mo 時，可溶性固形物含量介於 5.8–7.5°Brix 之間，而可滴定酸含量均在 0.22% 以下，食用味道已偏淡薄。

關鍵詞：椪柑、貯藏、果肉乾粒化、果實品質。

前言

椪柑 (*Citrus reticulata* Blanco) 是國內重要的寬皮柑種類之一，雖然近 10 年來種植面積逐年減少，由 2005 年的 7,246 ha，至 2014 年時已縮小為 5,841 ha，減少約 20%；然每公頃產量卻由 2005 年的 13,054 kg，增加至 2014 年的 23,497 kg，增幅約為 1.8 倍 (農業統計年報 103 年版)。由此顯示，除了農戶栽培技術愈加成熟之外，新植園也陸續進入成齡樹，故總栽培面積雖減少，年產量卻未降低。

一般而言，椪柑農戶對栽培管理技術之需求，除思考採用的管理模式需可維持樹勢處於豐產卻不衰弱、不隔年結果且果實品質優良之外，亦考量可販售的果實大小及貯藏力。為了維持樹體正常生長及穩定收益，椪柑果園需擬訂良好的肥培、水分及病蟲害管理策略；在水分管理部分，許多報告已指出其策略是否恰當，將影響枝梢萌發、開花表現 (Southwick & Davenport 1986)、花序型態、著果率 (Jahn 1973)、產量及品質 (Koo & Hurner 1969; Elfving & Kaufmann 1972; Levy *et al*. 1978; Chartzoulakis *et al*. 1996; Yakushiji *et al*. 1999) 等。然有關台灣在椪柑果實成熟期的水分管理方式，對其貯藏期間品質變化之相關報告仍然有限。本研究整理果實發育後期的降雨情形與植株斷水期限等，對所產果實貯藏期間數項品質指標值變化之影響，期能提供農友在面對果實成熟期降雨與採收前灌溉方式選擇時參考之用。

材料與方法

果園條件及斷水處理

本試驗於 2005/2006 及 2006/2007 等 2 個結果年期，在雲林縣古坑鄉圳頭坑黃姓專業柑橘農戶進行。供試果園為座北朝南向陽面；行草生栽培管理，土壤質地為砂質壤土；坡度介於 45–15° 間。果園於各試驗年期之 3 月份起，陸續進行開花調查，並於盛花期標示枝條之開

投稿日期：2016 年 5 月 24 日；接受日期：2016 年 8 月 2 日。
[*] 通訊作者：tang@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所園藝系助理研究員。台灣 嘉義市。

花日期，再於4月中、下旬進行試驗果實標示。供試植株之管理，均由農友以一般椪柑果園慣用方式為之，而水分管理部分農友僅負責至 9 月底；自 10 月份起直到各植株之預定斷水日止，此期間之管理由試驗人員接手，其方式為每週滴灌 2 次，每次 4 h，每株滴灌水量為 16 L。供試植株斷水日期之決定，係依盛花期推算 250 d 後為採收適期，分別在預定採收日前 56、28、14、7 及 3 d 進行斷水處理，每處理 4 重複，每重複 1 株，計 20 株。

斷水處理當天上午進行灌溉，於翌日下午進行地表覆蓋，其範圍為自樹幹起至樹冠下往外 1 m 處，以避免降雨或灌溉水進入土壤。2005 年覆蓋材料為透明塑膠布，2006 年為 Tyvek® 薄膜 (杜邦公司出品)。供試果園於適當地點設置簡易型氣象觀測站 (6152C Vantage Pro2)，以其傾斗式雨量計記錄果園降雨量；並以中央氣象局位於雲林縣古坑鄉之雨量站，所載雨量資料為降雨量觀測值。

果實貯藏試驗

兩個供試年期的果實分別於 2005 年 12 月 06 日及 2006 年 11 月 29 日採收，先於農戶集貨包裝場以柑橘分級機分級，同時進行剔除受傷及病蟲為害果實，之後 (當日) 運回行政院農業委員會農業試驗所之嘉義農業試驗分所。貯藏前果實先置於儲藏室中癒傷處理 3 d，癒傷結束當日首次調查貯藏試驗果實各項品質指標值之變化。

調查後將果實以聚乙烯袋逐一套裹，旋緊折疊袋口後置入塑膠籃中，再置於日常無人進出之儲藏室，採通風式貯藏，其溫度約 15 ± 3℃而相對濕度約 80%。

果皮厚及果肉乾粒化比率

果實分析時以個體為單位，每處理 20 果。分析時先將果實橫切為二半，以游標尺測量赤道處之果皮厚度。2006 年期之供試果實，在各次分析時於果皮剝除後以目視檢視果實各瓢瓣，當乾粒化之汁胞數量占整個果球之比率超過 10% 時，該個體即計為果肉乾粒化之果實，依其數量計算乾粒化比率，並以累計比率表現之。

果汁率、可溶性固形物及可滴定酸含量

將果肉以國際牌 (Panasonic；型號 MJ-C85N，Taiwan) 榨汁機榨汁，稱取果汁重以計算果汁率，之後將果汁攪拌均勻並過濾，取適量以屈折計 (Atago PAL-1 Co. Ltd., Tokyo, Japan) 測定可溶性固形含量 (total soluble solids; TSS)。所餘果汁再次攪拌均勻後，取原液 5 mL 加去離子水定量至 50 mL，以 SIGMA 公司出品之 NaOH 標準液，配置為 0.1 N 溶液後計量滴定至 pH 8.1 之體積，計算檸檬酸 (citric acid) 百分比 (%)，以可滴定酸含量 (titratable acidity; TA) 表示。

數據統計與分析

本文各試驗年期之數據，在測得各貯藏時間每樣品之各項品質指標數值後，以各重複計算平均值及標準誤差，再繪製成圖。

結果

水分管理對椪柑果肉乾粒化比率、果皮厚及果汁率之影響

於 2006 年期調查植株的斷水期限，對其所產果實貯藏期間顯現果肉乾粒化比率之影響。各斷水期限植株所產果實，在癒傷處理結束時均未取樣到果肉顯現乾粒化者；貯藏 1 mo 後，採收前 7 d 才斷水的植株，其所產果實已有 1.7% 的乾粒化比率，貯藏到 2 mo 時，僅採收前 56 d 即斷水者尚無果肉乾粒化，其餘斷水期限者，其果實的乾粒化比率均高於 2.8%；貯藏期延長至 3 mo 時，採收前 56 d 即斷水之植株，其所產果實已有 6% 顯現果肉乾粒化，至於採收前28 d內 (含 28 d) 才斷水者，其所產果實均有 13% 以上之乾粒化比率 (圖 1)。

供試期間的果園水分或可理解為 2005 年期較乾燥而 2006 年期較濕潤，此情形對癒傷處理後的果皮厚度，造成了些微的差異，即：2006 年期各斷水期限間差異未達 5% 顯著水準；而 2005 年期雖在各斷水期限之間有顯著差異，唯並非呈現早斷水者較厚或較薄之趨勢。果實貯藏 1mo 後，斷水期限對果皮厚度

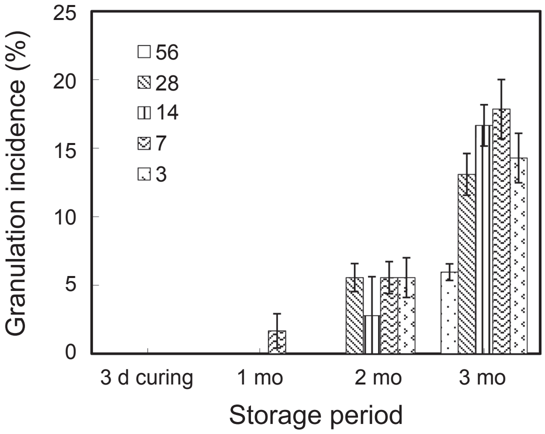


圖 1.　採前斷水處理天數對周徑 25 cm 之椪柑果實貯藏期間果肉乾粒化之影響。

Fig. 1.　Effect of withholding water supply before harvest on the incidence of granulation of medium size (25 cm) 'Ponkan' mandarin during storage. Means of 3 tree replicates (5 fruits per tree) with standard error.

之影響，在 2 個供試年別呈現不同趨勢，2005 年期是早斷水植株所產果實者果皮較薄；而 2006 年期則為早斷水植株所產果實者果皮較厚。待果實貯藏至 2 mo 後，各斷水期限之差異又不明顯；此外，2005 年期的果實，其果皮厚在貯藏期為 2 mo 內，係隨著貯藏時間的增加，果皮逐漸增厚；貯藏 3 mo 後，除了採收前 56 d 即斷水者之外，其餘處理之果皮厚度均不再增厚；而 2006 年期，在採收前 14 d 內才斷水者，與 2005 年期呈現相同的趨勢，但採收日 28 d 前 (含) 即斷水者，在貯藏至 2 mo 時，果皮厚度即不再增加。

斷水期限對果汁率的影響也存在年別差異；在 2005 年期，採收前 56 d 即斷水者所產果實，在癒傷處理結束日及貯藏 1 mo 後，果汁率均顯著高於其他斷水期限，期藏至 2 mo 後，各斷水期限之差異已無明顯趨勢；而 2006 年期各斷水期植株所產果實的果汁率無明顯之趨勢 (圖 2)。

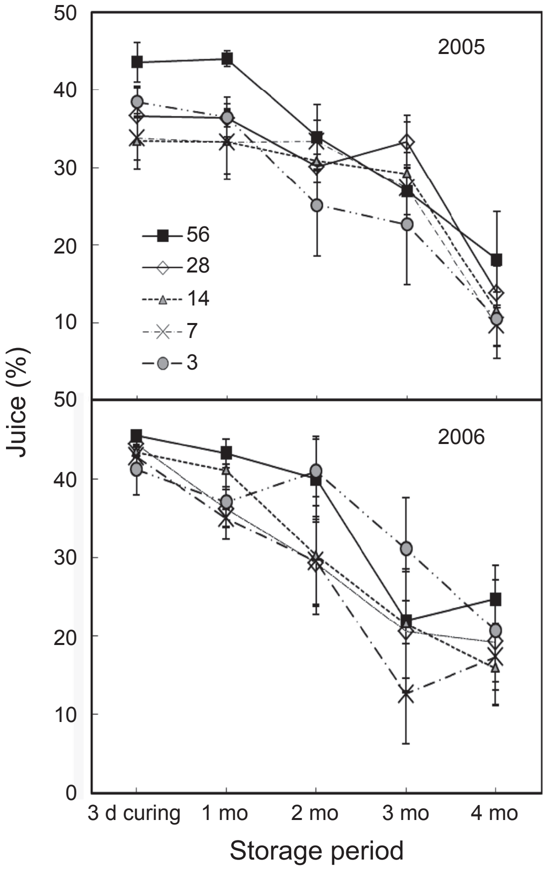


圖 2.　採收前斷水處理天數對周徑 25 cm 之椪柑果實貯藏期間果汁率之影響。

Fig. 2.　Effect of withholding water supply before harvest on the percentage of juice of medium size (25 cm) 'Ponkan' mandarin during storage. Means of 3 tree replicates (5 fruits per tree) with standard error.

水分管理對椪柑可溶性固形物、可滴定酸含量及糖酸比之影響

癒傷處理結束日的果實 TSS 含量，在 2005 年時以採收 28 d 前即斷水之植株所結者較高，且顯著高於採收前 14 d 內才斷水的植株所產之果實；但貯藏後各處理間無明顯差異 (表 1)。2006 年癒傷處理結束日之果實，僅採收前 56 d 即斷水者，其果實之 TSS 才顯著高於其他斷水期限者；而經過 1 mo 的貯藏，採收 56 d 前即斷水之植株所產果實，其可溶性固形物仍顯著高於採收前 14 d 內才斷水之植株所產者 (表 1)。

供試果實的 TA 含量均不甚高，2 個年期在癒傷處理結束日的椪柑，除了 2005 年採收前 28 d 即斷水之植株所產者偏低，僅 0.36% 之外，其餘不論植株之斷水期限為何，其含量均介於 0.42–0.48% 之間 (表 2)。隨著貯藏

表 1. 採收前斷水處理天數對周徑 25 cm 之椪柑果實貯藏期間可溶性固形物含量之影響。

Table 1. Effect of withholding water supply before harvest on total soluble solids (°Brix) of medium size (25 cm) 'Ponkan' mandarin during storage.

	Storage period			
Water withholding (d)	3 d curing	1 mo	2 mo	3 mo
2005				
56	8.2 ab[z]	8.7 a	8.2 a	7.2 a
28	8.4 a	9.0 a	8.0 a	7.5 a
14	7.6 b	8.5 a	8.1 a	6.6 a
7	7.6 b	9.0 a	7.7 a	6.6 a
3	7.8 ab	9.3 a	7.8 a	6.8 a
2006				
56	8.9 a	8.4 a	8.2 a	7.3 a
28	8.2 b	7.9 ab	7.2 a	6.9 ab
14	7.7 bc	7.4 bc	7.6 a	5.8 b
7	7.5 c	6.7 c	6.9 a	5.8 b
3	7.8 bc	7.2 bc	8.1 a	6.8 ab

[z] Means in each column with the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test.

表 2. 採收前斷水處理天數對周徑 25 cm 之椪柑果實貯藏期間可滴定酸含量之影響。

Table 2. Effect of withholding water supply before harvest on titratable acidity (% as citric acid) of medium size (25 cm) 'Ponkan' mandarin during storage.

	Storage period			
Water withholding (d)	3 d curing	1 mo	2 mo	3 mo
2005				
56	0.44 a[z]	0.37 b	0.32 a	0.20 b
28	0.36 d	0.35 c	0.30 b	0.19 b
14	0.42 c	0.39 a	0.29 b	0.20 b
7	0.43 ab	0.35 c	0.27 c	0.20 b
3	0.42 bc	0.33 d	0.31 b	0.22 a
2006				
56	0.48 a	0.39 a	0.34 a	0.20 a
28	0.45 ab	0.34 a	0.28 a	0.21 a
14	0.42 b	0.36 a	0.26 a	0.18 a
7	0.43 ab	0.38 a	0.29 a	0.18 a
3	0.42 b	0.37 a	0.33 a	0.20 a

[z] Means in each column with the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test.

期的延長，果實的 TA 逐漸下降，固酸比逐漸上升 (圖 3)，但在貯藏 3 mo 後，採收前 14 d 才斷水之植株所產果實，因 TSS 約已降低至 6°Brix，而 TA 已降至 0.2% 左右，食味早已偏淡 (表 1、表 2)。

討論

本研究顯示，在採收時果園仍處於濕潤狀況下的果園，如植株能在採收前 56 d 即斷水者，則果實貯藏至採收後 2 mo 仍未顯現果肉乾粒化，而採收前 7 d 才斷水者，其果實在貯

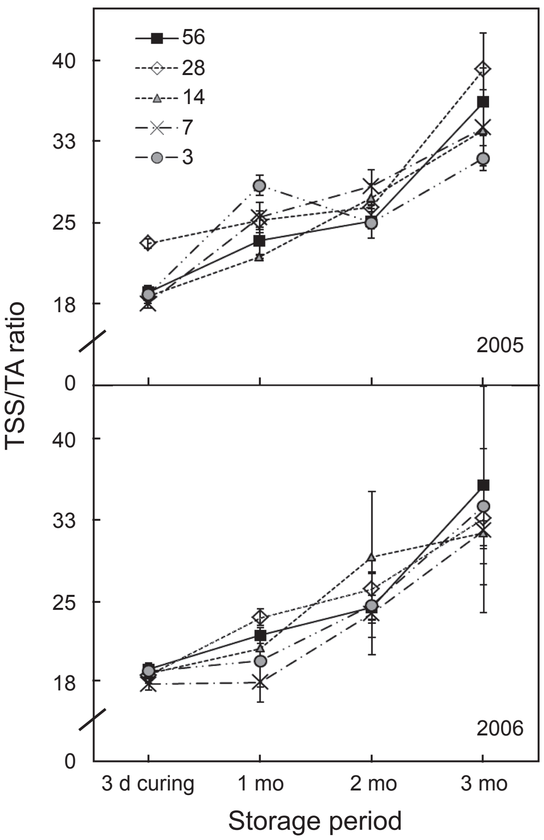


圖 3. 採收前斷水處理天數對周徑 25 cm 之椪柑果實貯藏期間糖/酸比之影響。

Fig. 3. Effect of withholding water supply before harvest on total soluble solids (TSS)/titratable acidity (TA) ratio of medium size (25 cm) 'Ponkan' mandarin during storage. Means of 3 tree replicates (5 fruits per tree) with standard error.

藏 1 mo 後即開始有果實顯現果肉乾粒化，且貯藏期延長至 3 mo 時，在採收前 28 d 內才斷水者，其所產果實之果肉乾粒化比率均高於 1 成 (圖 1)。顯示，若果實預定貯藏後再販售者，為減少果實貯藏後的乾粒化比率，宜儘早停止補充灌溉。果肉乾粒化係指柑橘果實瓤瓣，有部分 (或全部) 汁胞顯現出硬化、變色及食用味道變劣等問題的一種生理障礙 (Sinclair & Jolliffe 1961)，其發生率及發生程度受許多因素影響，諸如果園氣象條件、砧木種類、樹齡、果實著生位置、採收日期及果實大小 (Wen *et al*. 2013) 等。引起果肉乾粒化的確切原因目前尚不清楚，但一般柑橘在貯藏 2 mo 以後才比較容易顯現 (Burns & Albrigo 1998)，而本研究在採收前 7 d 才斷水者，其所產果實在貯後 1 mo 即開始顯現 (圖 1)，顯示，太晚斷水不利椪柑之貯藏。

斷水期限除了影響果肉乾粒化之外，對其他的品質指標值也有所影響。由於 2 個供試年期的果園水分狀況，或可簡單區分為 2005 年期較乾燥而 2006 年期較濕潤，且此差異使得各指標值受影響情形有所不同。當果園較乾燥 (2005 年期) 時，早斷水植株所產果實之果皮較薄，且貯藏到 2 mo 時，各處理之果皮厚度均隨貯藏期之延長而增加；而果園較濕潤時 (2006 年期)，早斷水者所產果實之果皮較厚，且果皮厚度也較早不再增厚 (表 3)。減少樹體供水量對未貯藏果實之果皮厚度的影響，有認為缺水使果皮較薄 (Castel & Buj 1990)，也有指出影響效果不明顯或有些年期呈顯著差異，而有些年期則未顯著 (Treeby *et al*. 2007; García-Tejero *et al*. 2010)。此與本研究之結果相符，亦即果園的整體乾燥情形會左右斷水後植體的生理反應，且可能需達 2 wk 的乾燥才引起差異 (Hockema & Etxeberria 2001)。

椪柑植株採收前的斷水期限，對癒傷處理結束日 (即採收後 3 d) 果實品質指標值變化之影響，與同一試驗之果實於採收後 2 d時分析之結果有部分相同而部分不同。採收後 2 d時的品質指標值顯示：較晚斷水之植株所產果實，有 TSS 與 TA 含量較低之情形，但對果汁率影響尚不顯著 (Tang *et al*. 2008)；而本文在 2005 年期癒傷處理結束日之果實的 TSS 含量，係與採收後 2 d 分析時相似；但各斷水期限之植株所產果實的果汁率，已與採收後 2 d時分析之結果不同，呈現較早斷水者之果汁率較採收前 14 d 內才斷水者高 (圖 2)，推測可能與果實癒傷期間的失水率改變了果汁所占比率有關。水分管理對果汁率的影響方面，有些報告指差異不顯著 (Castel & Buj 1990; Barry *et al*. 2004; García-Tejero *et al*. 2010)，但也有指出具負相關 (Pérez-Pérez *et al*. 2009)，有些報告則指出差異顯著與否視年期而異 (Romero *et al*. 2006)，與本研究之結果較為符合。

減少樹體的供水量可顯著增加所產果實

表 3. 採收前斷水處理天數對周徑 25 cm 之椪柑果實貯藏期間果皮厚之影響。

Table 3. Effect of withholding water supply before harvest on peel thickness (mm) of medium size (25 cm) 'Ponkan' mandarin during storage.

	Storage period			
Water withholding (d)	3 d curing	1 mo	2 mo	3 mo
2005				
56	2.0 cd[z]	2.3 b	3.1 a	3.6 a
28	2.5 a	2.5 b	3.2 a	2.7 b
14	2.3 ab	2.8 a	3.3 a	2.8 b
7	1.8 d	2.8 a	3.0 a	2.8 b
3	2.0 bc	2.6 ab	3.2 a	2.6 b
2006				
56	2.4 a	3.3 a	3.2 a	2.8 b
28	2.4 a	3.2 a	3.1 a	3.5 a
14	2.5 a	2.7 b	3.4 a	2.7 b
7	2.3 a	2.8 ab	3.1 a	3.2 ab
3	2.5 a	2.7 b	3.0 a	2.9 b

[z] Means in each column with the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test.

之果汁中 TSS 含量 (Albrigo 1975)，且供水量的減少與 TSS 之增加呈線性關係 (Castel & Buj 1990)；多數的報告也指出減少供水量，可使果汁中 TA 含量與 TSS 一樣呈現顯著增加 (Castel & Buj 1990; Treeby *et al*. 2007; García-Tejero *et al*. 2010)，或雖有影響但不顯著。將本研究的試驗結果，對應到減少供水量對上述各品質指標值之影響，顯示：早斷水者 (採收 28 d 以前) 其果汁中的 TSS 含量較晚斷水者高 (表 1)，但差異是否明顯視年期而異。由於 TSS 和 TA 的增加並非因為植株反應缺水而使果實較小，而是水分逆境壓力引起的滲透壓調節反應 (Hockema & Etxeberria 2001)，且乾旱對柑橘果實的影響，以漢林橙為材料所進行的研究顯示，植株需乾旱 14 d 後，果實的酸及糖含量才與對照有顯著差異，此或可說明在本研究中，何以在採收前 28 d 即斷水的植株，其果實之 TSS 含量，可高於採收前 14 d 內才斷水者。

風味淡薄或果肉乾粒化為椪柑貯藏後極易顯現之品質劣變方式，但採收時品質優良的果實，以適當方式可貯藏 3 mo。貯藏椪柑果汁中 TSS 含量在第 1 mo 略增之後逐漸下降，其增加值及之後 3 mo 內的降幅均 < 1°Brix；酸度在第 1 mo 下降略慢，經貯藏 3 mo 後平均約能維持在採收時含量之 70% 左右，品質仍然甚佳 (Liu *et al*. 1998; Liu *et al*. 2001; Liu *et al*. 2005)。將此結果對應到本研究中，在降雨較為緩和的 2005 年，於果實貯藏 1 mo 時，採收前 56 d 即斷水之植株所產果實的果汁率較高；而採收前 3 d 才斷水的植株所產果實，其果汁率在貯藏達 2 mo 時為所有斷水期限中最低者，唯差異不明顯 (圖 2)。至於貯藏後的 TSS 含量，在 2 個供試年期頗有差異，降雨情形較緩和的 2005 年，較符合一般椪柑貯藏時的變化趨勢，且採收前 28 d 即斷水之植株所產果實，可維持較緩慢的下降曲線，故實際顯現風味淡薄的時間點，可稍微較晚。至於接近果實採收期仍有明顯雨勢的 2006 年，並無貯藏第 1 mo 略增的情形，但與 2005 年期一樣，均以早斷水者降幅較小 (表 1)。綜合本研究調查之各項品質指標值在貯藏期間之變化情形，顯示採收 14 d 內 (含) 仍持續灌溉者，其果實較不適合進行長期的貯藏，仍以盡早販售為宜。

誌謝

本研究由行政院農委會計畫編號 94 農

科-1.3.2-農-C3、95 農科-1.3.2-農-C2 及 105 農科-9.4.2-農-C1 支持，雲林縣古坑鄉黃清武先生慨借果園配合試驗，研究助理黃槿綉、官美賢及黃冠榮等先後協助調查，謹此致謝。

引用文獻

Albrigo, L. G. 1975. Water relations and citrus fruit quality. p.41–48. *in*: Citrus Short Course: Water Relations. (Sauls, J. W. and L. K. Jackson, eds.) Fruit Crops Department, University of Florida. Gainiville, FL. 87 pp.

Barry, G. H., W. S. Castle, and F. S. Davies. 2004. Rootstocks and plant water relations affect sugar accumulation of citrus fruit via osmotic adjustment. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 129:881–889.

Burns, J. K. and L. G. Albrigo. 1998. Time of harvest and method of storage affect granulation in grapefruit. HortScience 33:728–730.

Castel, J. R. and A. Buj. 1990. Response of Salustiana oranges to high frequency deficit irrigation. Irrig. Sci. 11:121–127.

Chartzoulakis, K., N. Michelakis, and E. Stefanoudaki. 1999. Water use, growth, yield and fruit quality of 'Bonanza' oranges under different soil water regimes. Adv. Hort. Sci. 13:6–11.

Elfving, D. C. and M. R. Kaufmann. 1972. Diurnal and seasonal effects of environment on plant water relations and fruit diameter of citrus. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97:566–570.

García-Tejero, I., J. A. Jiménez-Bocanegra, G. Martínez, R. Rmero, V. H. Durán-Zuazo, and J. L. Muriel-Fernández. 2010. Positive impact of regulated deficit irrigation on yield and fruit quality in a commercial citrus orchard [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, cv. salustiano]. Agric. Water Manage. 97:614–622.

Hockema, B. R. and E. Etxeberria. 2001. Metabolic contributors to drought-enhanced accumulation of sugars and acids in oranges. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126:599–605.

Jahn, O. L. 1973. Inflorescence types and fruiting patterns in 'Hamlin' and 'Valencia' oranges and 'Marsh' grapefruit. Amer. J. Bot. 60:663–670.

Koo, R. C. J. and G. T. Hurner. 1969. Irrigation requirements of citrus grown on Lakewood fine sand. Proc. Fla. State Hort. Soc. 82:69–72.

Levy, Y., H. Bielorei, and J. Shalhevet. 1978. Long-term effects of different irrigation regimes on grapefruit tree development and yield. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103:680–683.

Liu, F. W., C. H. Han, and Y. C. Liang. 2005. Quantitative changes in each component of quality attributes in 'Ponkan' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco), 'Tankan' (*C. tankan* Hayata), and 'Liucheng' Orange (*C. sinensis* Osbeck) during longterm storage. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 51:217–228. (in Chinese with English abstract)

Liu, F. W., C. H. Pan, S. M. Hsueh, and T. H. Hung. 1998. Influences of maturity at harvest and storage temperature on the storability of 'Ponkan' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). J. Chinese Soc. Hort. Sci. 44:239–253. (in Chinese with English abstract)

Liu, F. W., S. M. Hsueh, and T. H. Hung. 2001. Influences of storage temperatures and bagging methods on storege losses and post-storage quality of 'Ponkan' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and Tankan (*Citrus tankan* Hayata). J. Chinese Soc. Hort. Sci. 47:383–390. (in Chinese with English abstract)

Pérez-Pérez, J. G., J. M. Robles, and P. Botía. 2009. Influence of deficit irrigation in phase III of fruit growth on fruit quality in 'lane late' sweet orange. Agric. Water Manage. 96:969–974.

Romero, P., J. M. Navarro, J. Pérez-Pérez, F. García-Sánchez, A. Gómez-Gómez, I. Porras, V. Martinez, and P. Botía. 2006. Deficit irrigation and rootstock: Their effects on water relations, vegetative development, yield, fruit quality and mineral nutrition of Clemenules mandarin. Tree Physiol. 26:1537–1548.

Sinclair, W. B. and V. A. Jolliffe. 1961. Chemical changes in the juice vesicles of granulated Valencia oranges. J. Food Sci. 26:276–282.

Southwick, S. M. and T. L. Davenport. 1986. Characterization of water stress and low temperature effects on flower induction in citrus. Plant Physiol. 81:26–29.

Tang, C. H., M. H. Lu, A. S. Hwang, and H. T. Hsu. 2008. Influence of refraining water supply before harvest on soil water content and fruit quality of 'ponkan' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). J. Chinese Soc. Hort. Sci. 54:287–293. (in Chinese with English abstract)

Treeby, M. T., R. E. Henriod, K. B. Bevington, D. J. Milne, and R. Storey. 2007. Irrigation management and rootstock effects on navel orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] fruit quality. Agric. Water Manage. 91:24–32.

Wen, M. X., X. G. Shi, P. Wang, and S. H. Wu. 2013. Physiological characteristics of different sizes of Satsuma mandarin fruit with granulation during storage stage. Acta Agric. Zhejiangensis 25:59–63.

Yakushiji, H., H. Nonami, T. Fukuyama, S. Ono, N. Takagi, and Y. Hashimoto. 1996. Sugar accumulation enhanced by osmoregulation in Satsuma mandarin fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121:466–472.

Effects of Pre-Harvest Water Management on Quantitative Changes of Quality Attributes in 'Ponkan' Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco)

Chia-Hui Tang[1,*]

Abstract

Tang, C. H. 2017. Effects of pre-harvest water management on quantitative changes of quality attributes in 'Ponkan' mandarin. J. Taiwan Agric. Res. 66(2):126–133.

To study the effect of pre-harvest water management on medium size (25 cm) 'Ponkan' mandarin, irrigation was suspended 56, 28, 14, 7 and 3 days prior to harvest and irrigation was withheld as a control in two consecutive years. Withholding water supply 7 days prior to harvest produced earlier the incidence of granulation than in the other treatments. After 1-month of fruit storage, withholding water supply 56 days prior to harvest produced more juice content than in the other irrigation treatments. At the initial storage, the total soluble solids (TSS) was observed increased at 2005 over the treatments. After 2-month of storage, it was found decreased, but not in fruit harvested from 2006. The TSS content of fruit decreased gradually with the advancement of the storage period and the decreasing trend was influenced significantly by different treatments.

Key words: 'Ponkan' mandarin, Storage, Granulation, Quality.

Received: May 24, 2016; Accepted: August 2, 2016.
[*] Corresponding author, e-mail: tang@dns.caes.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Department of Horticulture, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(2):134–145 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06602.06

研究報告

基改香蕉生物安全評估：對根圈土壤微生物相之影響

陳涵葳[1]　陳敬文[2]　曾清山[1]　吳明哲[3]　杜元凱[1,*]

摘要

陳涵葳、陳敬文、曾清山、吳明哲、杜元凱。2017。基改香蕉生物安全評估：對根圈土壤微生物相之影響。台灣農業研究 66(2):134–145。

基因改造作物可能對環境造成未知的風險，本研究利用平板計數法、微生物群落層級生理譜 (community-level physiological profiles; CLPP) 等方法評估 pflp (plant ferredoxin like protein) 香蕉轉殖系對根圈土壤微生物相之影響。試驗結果顯示，部分 pflp 轉殖系定植 1 mo 後，根圈土壤樣品之游離固氮菌及硝化細菌族群數目分別降低至 5.84–6.44 (log_{10} CFU g^{-1}) 及 5.38–5.96 (log_{10} CFU g^{-1})，顯著低於未轉殖對照品系 Gros Michel 之 6.59 及 6.52 (log_{10} CFU g^{-1})，但定植 3 yr 轉殖系與未轉殖對照品系之根圈土壤樣品中，纖維分解菌、尿素分解菌、游離固氮菌、硝化系菌和氨氧化菌族群數目均無顯著差異。本試驗共檢測 2,052 個菌落，皆未檢測出有外源基因 *npt*II 的水平轉移情形。將 CLPP 參數進行主成分分析、群集分析以及生物多樣性分析，結果顯示轉殖系與未轉殖對照品系間根圈土壤微生物相無顯著差異，亦不會影響根圈土壤微生物群落多樣性及均勻度。

關鍵詞：基改作物、生物安全評估、根圈、微生物群落。

前言

香蕉為芭蕉科 (*Musaceae*) 芭蕉屬 (*Musa*)，根據聯合國世界糧食暨農業組織 (Food and Agriculture Organization; FAO) 統計資料顯示，香蕉年產量達 105 百萬噸，在熱帶、亞熱帶地區超過 150 個國家栽培香蕉，目前栽培最多的國家為印度、中國、菲律賓、巴西及烏干達 (FAOSTAT 2016)。由於經濟栽培用途的香蕉多為三倍體，具有雌配子不孕、雄不稔及無種子的特性，雜交育種工作常因染色體倍體數或親本基因組來源不同而窒礙難行 (Swennen & Vuylsteke 1993)。在香蕉品種改良的策略上，雜交育種費時較長，而體細胞變異 (somoclonal variation) 株的選拔不確定性較高，以基因轉殖方式可以快速得到穩定表現目標性狀的香蕉轉殖系，且三倍體香蕉具無花粉、無種子的特性，外源基因流佈風險低 (Heslop-Harrison 2011)。2000 年烏干達政府支持國際香蕉促進聯盟 (International Network for the Improvement of Banana and Plantain; INIBAP)，利用生物技術提升東非高原香蕉產量；2005 年美國農業生物技術計畫 (Agricultural Biotechnology Support Project II; ABSPII) 資助康乃爾大學與烏干達國家農業研究機構，發展抗病香蕉轉殖技術，以維護東非高原香蕉生產；比爾蓋茲基金會亦在 2005 年提撥 5.1 億美元，支持澳洲昆士蘭科技大學研發富含維生素 A 與鐵離子等營養成分的香蕉，以解決非洲國家營養缺乏的問題。雖然，基因改造 (genetically modified) 技術是香蕉品種改良的捷徑，但隨著基改作物品項增加、栽培面提升，大眾對於基改作物的生物安全議題也愈發重視。台灣基改作物安全評估項目包括下

投稿日期：2016 年 5 月 20 日；接受日期：2016 年 8 月 8 日。
* 通訊作者：yktu@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會台東區農業改良場作物改良課助理研究員。台灣 台東市。
[3] 財團法人農業科技研究院植物科技研究所研究員兼所長。台灣 新竹市。

臺灣農業研究66(2) 06-杜元凱.indd 134　2017/6/14 下午 04:32:08

列 5 個方向：(1) 基改作物演變成雜草之可能性及其影響；(2) 基改作物對目標生物可能之直接或間接影響；(3) 基改作物對非目標生物可能之直接或間接影響；(4) 基改作物所含外源基因流入其他動植物、病原生物之可能性及其影響；(5) 基改作物發生基因外流時，對國內生態環境及原生種可能之影響 (Chan *et al*. 2004)。Angle (1994) 指出，基改作物及其產物通過根系分泌物或作物殘體進入土壤生態系統，可能與土壤微生物相互作用，造成土壤生物多樣性改變。因此，基改作物對土壤生態系統的影響受到眾多學者重視。

據估計，每克土壤中有上千種不同的微生物，大約 100 億個微生物，但由於培養基和培養條件的限制，目前可由傳統平板培養方法分離的微生物種類和數量僅占估計數量的 1–5%，而其餘 95–99% 微生物種群仍然未被分離 (Amann *et al*. 2000)，使得微生物族群難以定性描述。美國 Biolog 公司生產的微孔盤 (microplate) 是目前微生物群落層級多樣性 (community-level diversity) 研究的主流方法，可快速分析微生物群落功能性歧異度 (functional diversity)，得到微生物群落層級生理描述或稱群落層級生理譜 (community-level physiological profiles; CLPP) 的訊息。基改作物的外源基因和基因表達產物可通過根系分泌物或殘體進入土壤生態系統，根系釋放碳化合物數量的不同，將導致微生物群落對根釋放物質的利用及使用效率不同 (Fang *et al*. 2005)。長期種植會改變微生物的代謝途徑，這些微生物關係到植物殘體的分解作用、氨化作用、硝化作用、反硝化作用、酶的合成和活性，進而對土壤微生物多樣性造成影響 (Trevors *et al*. 1994)。而基改作物攜帶的抗生素篩選基因只有在特定的試驗條件下才能發生向土壤微生物轉移，且轉化成功率很低 (de Vries *et al*. 2001; Pontiroli *et al*. 2010)。

本試驗以平板計數法及 CLPP 法分析轉殖系根圈土壤微生物群落數量及多樣性，並利用聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 檢測外源基因發生水平轉移之可能性，以期能作為評估基改作物生物安全之參考。

材料與方法

香蕉根圈土壤採樣

本試驗所使用之基改香蕉材料共有 MVES-3、MVES-4、MVCS-6、MVCS-20 及 MCPER-3 等 5 個轉殖系，由中央研究院馮騰永研究員所提供；轉殖載體構築方式如 Dayakar *et al*. (2003) 所述，轉殖系均能穩定表現 *pflp* (plant ferredoxin-like protein) 外源基因，並對黃葉病原 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 具有抗性 (Yip *et al*. 2011)。本試驗另以 Gros Michel 及 Pei Chiao 為未轉殖 (WT) 之對照品系。試驗於 2011–2014 年在行政院農業委員會農業試驗所隔離田進行，田間配置採完全隨機設計，取樣位置包含 5 個轉殖系與 2 個未轉殖 (WT) 品系之根圈，以及沒有植物根系穿越的總體土壤 (bulk soil) 做為試驗控制組 (CK)；取樣時間為定植後第 1 mo 及宿根栽培第 3 年。每個取樣位置分別選定 3 個採土點，各採集土面下 15 cm 深度之根圈土壤 100 g，混合成為 1 個土壤樣品，以粗篩網過濾去除植物殘體與碎石後於室溫下陰乾備用，以進行後續微生物群落之檢測。

外源基因水平轉移檢測

取生長於含卡納黴素 (Kanamycin; Kan) 培養基上的菌落，以聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 檢測 *npt*II 外源基因。檢測之引子對為 sNPT-F (5’-CGCATGATTGAACAAGATGGATTGC-3’) 與 sNPT-R (5’-ATGTTTCGCTTGGTGGTCGAATGG-3’)。反應液中含有10× PCR buffer、10 mM dNTPs、10 mM引子及ProTaq™ DNA polymerase (PROTECH)；PCR 反應條件為 94℃持續 7 min 打開雙股，接著 94℃持續 30 s、56℃持續 30 s、72℃持續 30 s，共 27 個循環，最後於 72℃反應 10 min。PCR 增幅片段以 2.5% 之洋菜膠體電泳分離後記錄。

pflp 香蕉轉殖系根毛數量測定

5 個 pflp 轉殖系與未轉殖對照之 Gros Michel 及 Pei Chiao品系香蕉苗，經無菌處理與組織培養繼代繁殖後，挑選大小一致且未發

臺灣農業研究66(2) 06-杜元凱.indd 135 2017/6/14 下午 04:32:08

根之瓶苗進行試驗，無根瓶苗培養於 B3 固態培養基 (1/2 MS salts, 340 mg L^{-1} $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 160 mg L^{-1} adenine sulfate, 3% sucrose, pH 5.5, 0.7% agar)，於 25℃ ± 2℃、12 h 光照環境下培養 1 mo 之後出瓶，小植株出瓶後定植於 3 吋盆，盆中介質分別為滅菌之泥炭土及田間土壤，每處理共 10 盆，於溫室生長 1 mo 後於解剖顯微鏡下記錄蕉苗單位長度根毛數量。

土壤微生物群落分析─平板計數法

秤取 0.5 g 乾燥之土壤樣品，加入 49.5 mL 之 0.2% water agar，室溫下震盪 30 min 進行土壤微生物萃取，待土壤顆粒自然沉降後，取上層液並以 0.85% NaCl 進行序列稀釋。以選擇性培養基平板計數法偵測下列指標性微生物：總細菌 (total bacteria; TB) 及總真菌 (total fungi; TF) 選擇性培養基配方如 Mislivec *et al*. (1992) 所述；格蘭氏陰性菌 (Gram-negative bacteria; GNB)、蛋白質分解菌 (proteolytic bacteria; PB) 及尿素分解菌 (ureolytic bacteria; UB) 參照 Ting *et al*. (2008) 方法配製；纖維分解菌 (cellulose decomposing bacteria; CDB) 參考 Teather & Wood (1982)；溶磷菌 (inorganic phosphate solubilizing bacteria; iPSB) 是依據 Nautiyal (1999) 方法操作。游離固氮菌 (*Azotobacteria*; AZ)、硝化細菌 (nitrite oxidizing bacteria; NOB) 及氨氧化菌 (ammonia oxidizing bacteria; AOB) 仿效 Wang *et al*. (2012)。上述不同之選擇性培養基中分別加入 100 μL 之 10^3 稀釋液，以 L 型玻璃棒將菌液塗佈均勻，每種選擇性培養基試驗進行 3 重複。所有培養基皆以滅菌釜 121℃、1.2 kg cm^{-2}、15 min 條件滅菌。另依上述培養基配方及方法配置一批額外添加 50 mg L^{-1} Kan 之培養基，塗佈 100 μL 之 10^3 土壤微生物萃取稀釋液，用以檢測抗生素水平轉移。總真菌置於室溫培養 3 d；溶磷菌、尿素分解菌、游離固氮菌、硝化細菌及氨氧化菌於 28℃培養 7 d；總細菌、格蘭氏陰性菌、蛋白質分解菌及纖維分解菌置於 37℃烘箱培養 3 d。逐天觀察紀錄上述微生物族群菌落數。

土壤微生物群落分析─微生物群落層級生理分析

以 Biolog EcoPlate^{TM} (Biolog Inc.) 進行環境微生物 CLPP 多樣性分析，EcoPlate^{TM} 微孔盤底部塗佈不同的碳源與 tetrazolium 呈色劑，每重複包含 1 個空白對照與 31 種碳源，試驗共計 3 重複，EcoPlate^{TM} 於 37℃下預熱後，在樣品槽中注入 10^3 稀釋樣品 150 μL，置於 37℃培養 48 h，呈色結束後以全波長酵素免疫分析儀 (microplate manager benchmark plus reader, Rio-Red Laboratories Inc.) 偵測 590 nm 吸光值。樣品吸光值需經下列背景校正、誤差訊號排除、樣品槽平均發色 (average well color development; AWCD) 校正步驟，再進行統計分析。

Step 1：扣除背景值 $A_i' = A_i - A_0$
Step 2：排除誤差訊號 exclude $A_i' \le 0$ or $A_i' \ge 2$
Step 3：計算樣品槽平均發色

$$\mathrm{AWCD}\ (j,t) = \frac{1}{31}\sum_{i=1}^{31} \mathrm{OD}\ (i,j,t)$$

Step 4：呈色校正 $\mathrm{OD_{adj}}\ (i,j,t) = \dfrac{\mathrm{OD}\ (i,j,t)}{\mathrm{AWCD}\ (j,t)}$

A_0：未加碳源的空白對照組吸光值
A_i：i 碳源樣品槽吸光值
A_i'：扣除背景值之 i 碳源樣品槽吸光值
AWCD (j,t)：在 t 時間時，第 j 樣品盤 (重複) 的樣品槽平均發色
$\mathrm{OD_{adj}}$ (i,j,t)：在 t 時間時，第 j 樣品盤 (重複) 的 i 碳源樣品槽吸光校正值

訊息統計指數 (information statistic index) 依 Shannon & Wiener (1963) 所列公式進行計算：

$$\text{Shannon index } (H') = -\sum Pi \ln Pi \quad (1)$$

$$\text{Shannon evenness } (E) = \frac{H'}{\ln S} \quad (2)$$

Pi：第 *i* 個呈色樣品槽占全部樣品槽中有呈色樣品槽之比例
S：已呈色樣品槽的數量

統計分析

本試驗數據以 SAS 套裝軟體 (SAS version 7.1, SAS institute, Cary, NC, USA) 進行變方分析 (one-way ANOVA)、主成分分析 (principal components analysis; PCA) 及最小顯著差異性測驗 (Fisher's protected least significant difference test; LSD test) 比較各處理平均值間之差異性。

結果與討論

pflp 香蕉轉殖系對根圈土壤微生物數量之影響

植物根部分泌物 (root exudate) 組成包含醣類、胺基酸、有機酸、固醇類、酵素，以及植物荷爾蒙，能促進或抑制之微生物生長，影響根圈土壤微生物群落分布，進而改變根圈土壤的理化特性 (Nardi *et al*. 2000)。本試驗分析不同採樣時間之香蕉根圈土壤樣品，評估 pflp 香蕉轉殖系對土壤微生物造成之短期及長期影響。試驗結果顯示，轉殖系在定植後第 1 mo，對 TF、TB、ACT 與 GNB 等非特定微生物族群 (common microorganisms) 數量影響小，轉殖系 MVES-4、MVES-6 與未轉殖對照組在 TF、TB 與 GNB 間無顯著差異，而 MVCS-20 與 MCPER-3 轉殖系每克根圈土壤中 ACT 菌落形成單位 (colony forming unit; CFU) 之對數值分別為 5.22 與 5.19，顯著低於 Gros Michel 與 Pei Chiao 之 5.38 (log_{10} CFU g^{-1})，MVES-3 根圈土壤之 TF、ACT 與 GNB 族群數量則比未轉殖對照品系高 (表 1)。pflp 香蕉轉殖系對功能性微生物族群 (functional microorganisms) 數量的影響方面，定植 1 mo 後 PB 與 iPSB 的族群數量在轉殖品系與未轉殖對照組間無顯著差異，但 UB 族群在轉殖系 MVES-4、MVES-6 及 MVCS-20 之根圈土壤中分布不均勻，3 次取樣計數結果差異很大，較難判斷這些轉殖系是否對 UB 族群生長發生抑制作用。而轉殖系 MVES-3、MVES-4、MVCS-6、MVCS-20 及 MCPER-3 在定植 1 mo 後，根圈土壤中 CDB、AZ 及 NOB 族群數量顯著少於未轉殖對照品系 (表 1)。檢測宿根栽培第 3 年之根圈土壤樣品結果顯示，TB、CDB、UB、AZ、NOB、AOB 族群數目在轉殖系與未轉殖對照品系間無顯著差異，而轉殖系 MVES-3、MVES-4 宿根栽培根圈土壤中 PB 與 iPSB 族群數量顯著高於未轉殖對照品系 (表 1)。由上述結果推論，pflp 香蕉轉殖系對栽培初期根圈土壤微生物族群分布影響較大，尤其是 AZ、NOB 的族群數量，但是對宿根栽培第 3 年的根圈土壤則無此現象，除 PB 與 iPSB 族群外，轉殖系與未轉殖對照品系間皆無顯著差異。平板計數法之生物多樣性分析指標也顯示，pflp 香蕉轉殖系宿根栽培第 3 年之根圈，土壤微生物群落多樣性與均勻度與未轉殖對照品系間無顯著差異 (表 2)。pflp 香蕉轉殖系對根圈土壤微生物之影響，可能來自根部 ROS 表現量提升，以及根毛結構之改變。目前已知穩定表現 pflp 基因之阿拉伯芥轉殖系，除了提升抗病能力外，其根部活性氧化物 (reactive oxygen species; ROS) 含量較高。由於根毛發育與 ROS 之表現關係密切，所以 pflp 阿拉伯芥轉殖系與未轉殖對照組相比，其根毛發育顯著較多且長 (Shin *et al*. 2011)；而本試驗為瞭解 pflp 基因表現是否也能影響香蕉轉殖系根毛發育，將各品系香蕉組培苗移植至含有田間土壤及無菌泥炭土的盆中種植 1 mo，試驗結果顯示 pflp 單位根長度的根毛數量與未轉殖對照品種間並無顯著差異 (圖 1)。可能是因為 pflp 基因選殖自雙子葉甜椒中，雙子葉植物基因於單子葉植物中表現時，常會發生密碼子偏移 (codon bias) 現象 (Kawabe & Miyashita 2003)，使轉殖基因功能性與原來不盡相同，或是 CaMV 35S 啟動子在單子葉植物中表現量較低、組織細胞特異性表現所致 (Benfey & Chua 1989; Battraw & Hall 1990)。但 pflp 香蕉轉殖系根部 ROS 含量是否提升，仍待進一步試驗釐清。Lu *et al*. (2008) 為探討基因轉植香蕉植株對根圈土壤微生物的影響，將穩定表現 Gus-*npt*II 外源基因之香蕉轉殖系定植於田間，在苗期、成苗期、花序抽出期採樣並檢測土壤微生物數量變化。結果顯示，香蕉轉殖系對各個時期的根圈土壤微生物數量沒有顯著影響。pflp 香蕉轉殖系 (轉殖親本為 'Sukari

表 1. pflp 香蕉轉殖系與非轉殖對照組對根圈土壤微生物族群數目之影響。

Table 1. The quantity of culturable microflora[z] in rhizosphere soils of pflp and non-transgenic banana lines, log_{10} CFU g^{-1} (dry soil)[z].

Transplanting period	Sampling site[y]	Common microorganism				Functional microorganism						
		TF	TB	ACT	GNB	PB	CDB	iPSB	UB	AZ	NOB	AOB
1st month	Bulk soil (CK)	4.64 ± 0.09 bc[x]	5.57 ± 0.06 a	5.26 ± 0.06 c	5.77 ± 0.04 a	5.36 ± 0.33 a	5.70 ± 0.10 ab	5.68 ± 0.22 a	5.59 ± 0.12 a	6.69 ± 0.04 a	6.52 ± 0.10 a	6.48 ± 0.06 a
	Gros Michel (WT)	4.01 ± 0.11 c	5.55 ± 0.17 a	5.38 ± 0.06 b	5.48 ± 0.06 a	5.10 ± 0.19 a	5.80 ± 0.14 a	5.54 ± 0.08 a	5.11 ± 0.37 a	6.59 ± 0.09 a	6.52 ± 0.06 a	6.04 ± 0.14 c
	Pei Chiao (WT)	4.73 ± 0.07 bc	5.77 ± 0.07 a	5.38 ± 0.07 b	5.09 ± 0.14 a	5.16 ± 0.31 a	5.48 ± 0.06 bc	5.58 ± 0.07 a	5.09 ± 0.95 a	6.61 ± 0.04 a	6.60 ± 0.09 a	6.30 ± 0.04 b
	MVES-3	5.00 ± 0.09 a	5.69 ± 0.02 a	5.78 ± 0.01 a	5.30 ± 0.29 a	5.60 ± 0.38 a	5.29 ± 0.06 c	5.68 ± 0.12 a	4.10 ± 0.17 ab	5.84 ± 0.03 e	5.38 ± 0.10 c	5.72 ± 0.11 d
	MVES-4	3.82 ± 0.38 c	5.58 ± 0.14 a	5.47 ± 0.02 b	4.79 ± 0.30 a	5.76 ± 0.25 a	5.26 ± 0.16 c	5.70 ± 0.03 a	1.43 ± 2.48 b	5.88 ± 0.08 de	5.45 ± 0.11 c	5.67 ± 0.07 d
	MVCS-6	4.70 ± 0.50 bc	5.71 ± 0.09 a	5.49 ± 0.04 b	5.27 ± 0.53 a	5.36 ± 0.05 a	5.44 ± 0.13 c	5.60 ± 0.12 a	2.97 ± 2.57 ab	6.16 ± 0.09 c	5.91 ± 0.07 b	6.01 ± 0.11 c
	MVCS-20	4.75 ± 0.34 bc	5.63 ± 0.09 a	5.22 ± 0.14 c	5.07 ± 1.07 a	5.42 ± 0.08 a	5.46 ± 0.21 c	5.65 ± 0.13 a	2.93 ± 2.56 ab	6.44 ± 0.12 b	5.96 ± 0.22 b	6.02 ± 0.06 c
	MCPER-3	4.29 ± 0.26 bc	5.52 ± 0.12 a	5.19 ± 0.08 c	5.06 ± 0.27 a	5.08 ± 0.44 a	5.43 ± 0.12 c	5.75 ± 0.11 a	5.31 ± 0.14 a	6.01 ± 0.11 d	5.95 ± 0.10 b	6.06 ± 0.08 c
3rd year	Bulk soil (CK)	3.63 ± 0.31 d	5.28 ± 0.16 a	5.26 ± 0.19 a	4.48 ± 0.34 b	4.56 ± 0.08 b	5.16 ± 0.07 a	5.03 ± 0.03 b	4.05 ± 0.14 a	5.01 ± 0.08 a	4.50 ± 0.25 a	4.86 ± 0.17 a
	Gros Michel (WT)	3.81 ± 0.27 cd	5.35 ± 0.13 a	5.06 ± 0.01 b	4.96 ± 0.07 ab	4.66 ± 0.14 b	5.01 ± 0.13 a	5.13 ± 0.03 b	3.84 ± 0.12 a	4.90 ± 0.17 a	4.76 ± 0.05 a	5.11 ± 0.13 a
	Pei Chiao (WT)	4.36 ± 0.12 b	5.32 ± 0.16 a	5.25 ± 0.12 a	5.15 ± 0.06 a	4.65 ± 0.14 b	5.05 ± 0.02 a	5.04 ± 0.05 b	3.66 ± 0.22 a	4.84 ± 0.10 a	4.65 ± 0.22 a	5.11 ± 0.11 a
	MVES-3	4.14 ± 0.13 bc	5.52 ± 0.34 a	5.28 ± 0.05 a	5.29 ± 0.07 a	5.06 ± 0.07 a	5.08 ± 0.50 a	5.34 ± 0.11 a	3.98 ± 0.07 a	4.90 ± 0.01 a	4.70 ± 0.04 a	4.98 ± 0.12 a
	MVES-4	4.08 ± 0.17 bc	5.35 ± 0.05 a	4.86 ± 0.08 c	4.80 ± 0.26 ab	5.24 ± 0.10 a	5.24 ± 0.15 a	5.30 ± 0.04 a	3.76 ± 0.41 a	5.04 ± 0.04 a	4.63 ± 0.28 a	5.03 ± 0.04 a
	MVCS-6	4.79 ± 0.30 a	5.32 ± 0.07 a	4.82 ± 0.08 c	5.18 ± 0.21 a	5.12 ± 0.18 a	5.37 ± 0.07 a	5.07 ± 0.10 b	3.74 ± 0.23 a	4.88 ± 0.08 a	4.87 ± 0.02 a	5.00 ± 0.11 a
	MVCS-20	3.79 ± 0.33 cd	5.36 ± 0.17 a	5.13 ± 0.15 ab	4.55 ± 0.67 b	5.21 ± 0.06 a	5.20 ± 0.03 a	5.13 ± 0.11 b	3.72 ± 0.12 a	4.76 ± 0.18 a	4.60 ± 0.22 a	5.05 ± 0.22 a
	MCPER-3	3.83 ± 0.16 cd	5.32 ± 0.09 a	5.15 ± 0.06 ab	4.82 ± 0.13 ab	4.64 ± 0.11 b	5.11 ± 0.12 a	5.07 ± 0.05 b	3.73 ± 0.05 a	4.94 ± 0.17 a	4.81 ± 0.11 a	5.09 ± 0.16 a

[z] Microflora testing included total fungi (TF), total bacteria (TB), actinomyces (ACT), gram-negative bacteria (GNB), proteolytic bacteria (PB), cellulose decomposing bacteria (CDB), inorganic phosphate solubilizing bacteria (iPSB), ureolytic bacteria (UB), *Azotobacteria* (AZ), nitrite oxidizing bacteria (NOB), and ammonia oxidizing bacteria (AOB).

[y] Rhizosphere soils collected from 3 sampling points per site were mixed as a composite sample.

[z] Means ± standard error (n = 3) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at $\alpha = 0.05$ by Fisher's protected LSD test.

表 2. pflp 香蕉轉殖系與非轉殖對照組對根圈土壤微生物歧異度指標之影響。

Table 2. Effects of the pflp and non-transgenic banana lines on the functional diversity index of microflora in rhizosphere soils.

		Plat counting method		CLPP method	
Transplanting period	Sampling site	Shannon's index	Shannon evenness	Shannon's index	Shannon evenness
1st month	Bulk soil	1.75 ± 0.04 cd[z]	0.52 ± 0.02 de	3.03 ± 0.06 a	0.96 ± 0.05 a
	Pei Chiao	1.66 ± 0.12 d	0.48 ± 0.06 e	2.95 ± 0.21 a	0.90 ± 0.01 a
	Gros Michel	1.65 ± 0.09 d	0.48 ± 0.04 e	2.92 ± 0.15 a	0.91 ± 0.01 a
	MVES-3	2.17 ± 0.02 a	0.79 ± 0.01 a	2.76 ± 0.06 a	0.89 ± 0.01 a
	MVES-4	2.05 ± 0.03 b	0.75 ± 0.02 ab	2.91 ± 0.03 a	0.88 ± 0.04 a
	MVCS-6	2.02 ± 0.06 b	0.71 ± 0.04 bc	2.81 ± 0.02 a	0.89 ± 0.01 a
	MVCS-20	1.80 ± 0.03 c	0.57 ± 0.03 d	3.01 ± 0.07 a	0.86 ± 0.03 a
	MCPER-3	2.01 ± 0.04 b	0.68 ± 0.02 c	2.62 ± 0.11 a	0.90 ± 0.02 a
3rd year	Bulk soil	2.04 ± 0.12 a	0.70 ± 0.09 a	3.00 ± 0.04	0.92 ± 0.03 a
	Pei Chiao	2.13 ± 0.06 a	0.77 ± 0.04 a	2.99 ± 0.12 a	0.94 ± 0.11 a
	Gros Michel	2.14 ± 0.03 a	0.77 ± 0.02 a	3.18 ± 0.09 a	0.93 ± 0.01 a
	MVES-3	2.03 ± 0.20 a	0.70 ± 0.13 a	3.25 ± 0.03 a	0.96 ± 0.02 a
	MVES-4	2.13 ± 0.08 a	0.76 ± 0.06 a	3.10 ± 0.02 a	0.93 ± 0.01 a
	MVCS-6	2.20 ± 0.06 a	0.82 ± 0.05 a	3.19 ± 0.01 a	0.95 ± 0.02 a
	MVCS-20	2.07 ± 0.17 a	0.73 ± 0.12 a	2.76 ± 0.04 a	0.88 ± 0.04 a
	MCPER-3	2.14 ± 0.03 a	0.77 ± 0.02 a	3.05 ± 0.06 a	0.93 ± 0.01 a

[z] Means ± standard error (n = 3) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

Ndizi'，AAB 基因組) 的安全評估試驗已於烏干達康培拉 (Kampala) 完成，單股結構多形性 (single-strand conformation polymorphism; SSCP) 結果顯示，宿根栽培 3 yr 之轉殖系與未轉殖對照品系，其根圈土壤微生物並無顯著差異。配合次世代定序技術分析根圈土壤微生物多樣性，結果亦顯示轉殖系與未轉殖品種間無顯著差異 (Nimusiima *et al*. 2015)。

pflp 香蕉轉殖系外源基因水平轉移風險評估

植物中 25% 的碳同化物會從根部釋放至土壤環境中 (Philippot *et al*. 2013)，基改作物的外源基因產物也可經由此途徑進入生態系中。目前已知細菌基因轉移的形式可分成導入 (trasnduction)、接合 (conjugation) 與轉型 (transformation) 等 3 種，而轉型是指微生物攝入裸露的 DNA 片段，再整合入微生物基因組的過程，自然界中已有不少植物的基因片段經轉型作用進入微生物的案例。如在沼澤等低氧環境下，可旺盛生長的透明顫菌屬 (*Vitreoscilla* sp.) 會表現一種血紅蛋白 (hemoglobin) 以提高菌體氧氣利用能力，而這種蛋白與羽扇豆所表現的豆科血紅蛋白 (leghemoglobin) 之序列具有高度同源性 (Wakabayashi *et al*. 1986)，可能是物種間發生轉型作用的結果 (Nielsen *et al*. 1998)。本試驗檢測 pflp 香蕉轉殖系根圈土壤微生物對 Kan 的抗性，轉殖系定植 1 mo 後，僅 MVCS-6 轉殖系根圈土壤中 iPSB 族群對 Kan 抗性提升 (表 3)，但對抗性菌落進行 PCR 則沒有偵測到 *npt*II 外源基因 (圖 1)；檢測宿根栽培第 3 年根圈土壤微生物對 Kan 抗性結果顯示，轉殖系 MCPER-3、MVES-3 及 MVES-4 分別顯著提高 PB、CDB 及 NOB 族群對 Kan 之抗性 (表 3)，本試驗共檢測 2,052 個菌落，皆未檢測出有外源基因 *npt*II 的水平轉移情形 (圖 2)。一般情況下物種間基因水平轉移發生機率相當低，約在

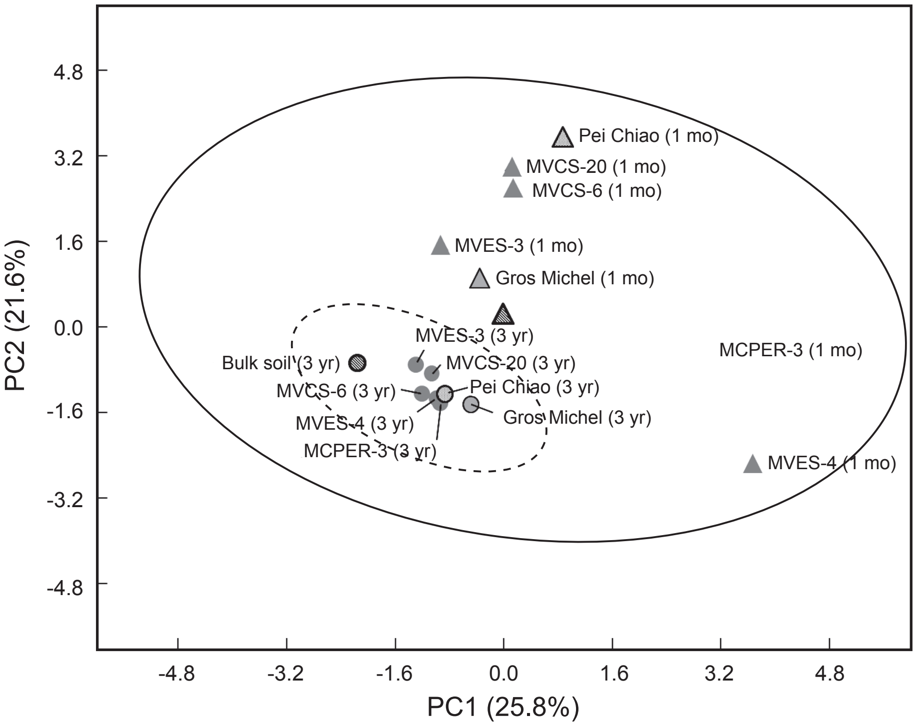


圖 1.　不同香蕉品系根圈土壤微生物對 EcoPlate™ 碳源利用之主成分分析。

Fig. 1.　Principle component analysis of EcoPlate™ carbon substrates utilized by microflora in rhizosphere and bulk soils of different banana lines. Scores of each sample for the first and second PCs were plotted. Symbol type indicates different rhizosphere soil sampling times. The soil samples were collected from the rhizosphere of each banana lines at 1 mo (triangle symbol) and 3 yr (circle symbol) after transplanting. Bulk soil samples were collected outside the rhizosphere of banana plants. The solid and dashed ellipses describe 95% confidence region of 1 mo and 3 yr samples respectively.

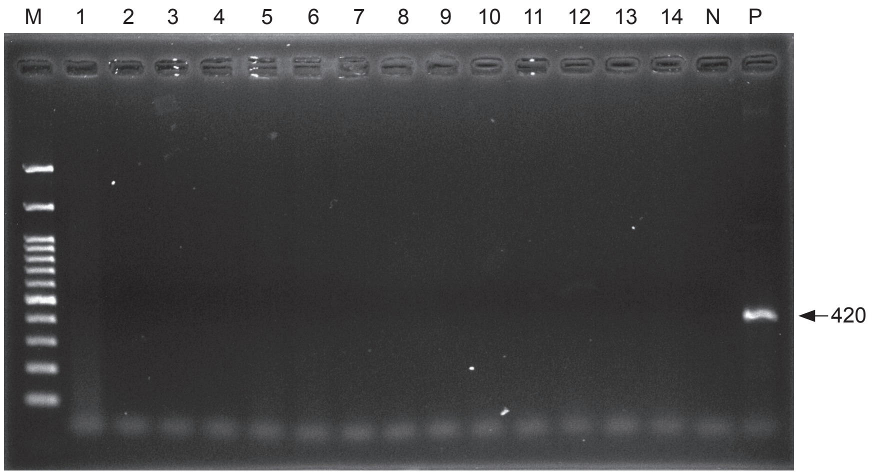


圖 2.　以聚合酶鏈鎖反應檢測基改香蕉外源基因水平流佈。

Fig. 2.　The gene flow detection of soil microorganisms in field-cultivated pflp transgenic banana lines. Lane M, 100 bp marker; Lane 1–14, Kanamycin-resistant iPSB isolated from MVES-6 rhizosphere soil; Lane N, negative control line; and Lane P, positive control (*ntp*II gene).

表 3. 功能性根圈土壤微生物對卡納黴素之抗性反應。

Table 3. Kanamycin resistance rate of functional microflora in rhizosphere soils of pflp and non-transgenic banana lines[z].

Transplanting period	Sampling site[y]	Kanamycin resistance rate (%)						
		PB	CDB	iPSB	UB	AZ	NOB	AOB
1st month	Bulk soil	017.5 ± 6.6 b[x]	03.7 ± 1.9 b	01.7 ± 1.8 b	00.0 ± 0.0 a	0.4 ± 0.2 bc	0.2 ± 0.1 d	0.0 ± 0.0 b
	Gros Michel	059.4 ± 18.7 a	00.7 ± 0.3 b	03.6 ± 3.2 b	00.0 ± 0.0 a	0.8 ± 0.5 abc	0.3 ± 0.3 cd	0.0 ± 0.0 b
	Pei Chiao	000.9 ± 1.6 b	28.9 ± 10.5 a	03.9 ± 3.5 b	00.0 ± 0.0 a	1.6 ± 0.3 ab	0.1 ± 0.1 d	0.3 ± 0.2 ab
	MVES 3	027.3 ± 25.5 ab	08.3 ± 4.4 b	03.1 ± 2.8 b	00.0 ± 0.0 a	1.8 ± 2.0 a	0.0 ± 0.0 d	2.3 ± 4.1 a
	MVES 4	003.0 ± 2.9 b	03.0 ± 5.2 b	01.2 ± 2.1 b	00.0 ± 0.0 a	0.3 ± 0.6 c	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 b
	MVCS 6	003.4 ± 2.2 b	22.9 ± 25.1 a	45.9 ± 21.5 a	00.0 ± 0.0 a	0.4 ± 0.3 bc	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 b
	MVCS 20	016.7 ± 2.3 b	05.1 ± 0.4 b	06.0 ± 6.2 b	00.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 d	0.6 ± 0.5 ab
	MCPER 3	033.7 ± 19.3 ab	04.2 ± 1.9 b	00.6 ± 1.1 b	00.0 ± 0.0 a	0.8 ± 0.5 abc	0.9 ± 0.8 bc	1.2 ± 0.5 ab
3rd year	Bulk soil	044.7 ± 12.0 b	04.6 ± 0.4 b	00.8 ± 0.8 a	02.2 ± 3.8 a	0.3 ± 0.5 b	0.0 ± 0.0 b	0.6 ± 0.5 b
	Gros Michel	034.8 ± 50.2 b	10.0 ± 8.6 b	01.1 ± 0.4 a	00.0 ± 0.0 a	0.5 ± 0.8 b	0.5 ± 0.9 b	2.0 ± 1.4 ab
	Pei Chiao	050.8 ± 12.8 b	08.9 ± 10.4 b	02.2 ± 1.9 a	00.0 ± 0.0 a	6.8 ± 2.5 a	0.0 ± 0.0 b	1.3 ± 1.2 b
	MVES 3	032.4 ± 10.1 b	56.4 ± 48.6 a	01.4 ± 0.3 a	00.0 ± 0.0 a	4.6 ± 6.3 b	2.8 ± 2.6 ab	1.6 ± 1.8 ab
	MVES 4	007.4 ± 8.0 b	14.2 ± 6.8 b	01.7 ± 0.6 a	02.8 ± 4.8 a	2.2 ± 2.5 b	4.7 ± 3.4 a	1.5 ± 1.3 ab
	MVCS 6	045.0 ± 33.1 b	26.9 ± 12.7 ab	02.4 ± 1.1 a	00.0 ± 0.0 a	4.8 ± 4.6 b	0.8 ± 1.4 b	1.8 ± 1.1 ab
	MVCS 20	024.6 ± 5.6 b	03.3 ± 0.5 b	01.3 ± 0.3 a	00.0 ± 0.0 a	3.1 ± 1.8 b	2.8 ± 3.4 ab	4.6 ± 3.9 a
	MCPER 3	106.7 ± 39.0 a	23.6 ± 2.9 b	03.1 ± 3.0 a	06.7 ± 11.5 a	2.7 ± 3.4 b	1.8 ± 1.6 ab	3.5 ± 1.6 ab

[z] Microflora testing included proteolytic bacteria (PB), cellulose decomposing bacteria (CDB), inorganic phosphate solubilizing bacteria (iPSB), ureolytic bacteria (UB), *Azotobacteria* (AZ), nitrite oxidizing bacteria (NOB), and ammonia oxidizing bacteria (AOB). The selective media contained kanamycin (50 mg L^{-1}).

[y] Rhizosphere soil from the 3 sampling point per site were mixed as a composite rhizosphere soil sample.

[x] Means ± standard error (n = 3) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

10^{-3}–10^{-17} 間 (Nielsen *et al*. 2000; Meier & Wackernagel 2001)；Nicolia *et al*. (2014) 更指出，水平轉移可能只在特定實驗室條件下低頻率發生。基因水平轉移難偵測且常常被低估原因，是在於大部分發生移轉的基因都呈現鑲嵌 (mosaic) 的狀態，而自然狀況下基因發生移轉到新性狀表現需要的時間可能需要數百萬年，除非改變環境，提高選拔壓力，或是增加重組頻率才有可能加速，但這也不是在基改作物單一生長週期內可能發生的現象 (Heinemann & Traavik 2004)。

pflp 香蕉轉殖系根圈土壤微生物群落層級生理分析

CLPP 是一個快速簡便且靈敏度高的方法，可以獲得較為詳盡的環境微生物群落結構和功能多樣性方面的資訊，其在研究微生物群落功能多樣性上頗具潛力，目前也有廣泛的應用。本試驗利用 Biolog 公司生產之 EcoPlate™ 微孔盤，檢測 pflp 轉殖系根圈土壤微生物群落對 31 碳源的利用能力，得到 CLPP 資料訊息。將微孔盤樣品吸光值資料計算 AWCD 後進行校正後進行統計分析，主成分分析結果顯示第一主成分 (PC1) 占總變異的比例達 25.8%，31 種碳源中以 pyruvic acid methyl ester、L-asparagine 及 putrescine 等為主要變異量；第二主成分 (PC2) 占總變異的比例為 21.6%，其中 D-mannitol 及 putrescine 對第二主成分的影響較大，PC1 與 PC2 無法區別 pflp 轉殖系與未轉殖對照品系根圈土壤樣品微生物對碳源利用的差異，但可見宿根種植第 3 年之香蕉根圈土壤樣品點集中於的 3 象限。定植後 1mo 之根圈土壤樣品點則沿 PC2 正向分布，顯示 PC2 對定植 1 mo 之 Pei Chiao、Gros Michel、MVES-3、MVCS-6 及 MVCS-20 根圈土壤微生物影響較 PC1 大，且定植後 1 mo 之 bulk soil 樣品相當接近原點，表示該取樣位置的微生物群落對各種碳源的利用率均低 (圖 1)。植物根系分泌物組成分影響根圈微生物的生長，缺乏植物根際分泌物質及養分之 bulk soil 微生物含量通常較低 (Somers *et al*. 2004)，而香蕉根圈微生物群落對不同碳源代謝能力，在定植 1 mo 時歧異度較大。由圖 1 可知，MCPER-3 與 MVES-4 樣品點位於第 4 象限，定植 1 mo 的根圈土壤樣品點 95% 信賴區間大於宿根種植第 3 年之樣品點，轉殖系與未轉殖對照品系間的差異無法區分 (圖 1)。將 CLPP 參數進行群集分析，由圖 3 亦可見宿根種植第 3 年的根圈土壤微生物群落對碳源利用能力較相似。本試驗之主成分分析與群集分析結果，可區別定植後 1 mo 與宿根栽培第 3 年之根圈土壤樣品，但無法區分轉殖系與未轉殖對照品系間差異。CLPP 之生物多樣性分分析的結果也顯示，pflp 轉殖系不會影響根圈土壤微生物群落多樣性及均勻度 (表 2)。Lu *et al*. (2008) 利用 Biolog GN™ 微孔盤探討 Gus-nptII 香蕉轉殖系根圈土壤微生物群落結構與功能，研究結果指出轉殖系對樣品槽平均發色變化曲線、Shannon index、Shannon evenness、Simpson index、Mcintosh index 及 Mcintosh evenness 均無顯著影響，顯示 Gus-*npt*II 香蕉轉殖系對根圈土壤微生物群落結構和功能多樣性沒有影響。

結論

本試驗分析不同採樣時間的香蕉根圈土壤微生物，CDB、AZ 及 NOB 族群數量在轉殖系定植後 1 mo 顯著降低，但宿根栽培第 3 年之轉殖系根圈土壤樣品 PB 菌落數顯著高於未轉殖對照組，且 pflp 單位根長度的根毛數量與未轉殖對照品種間並無顯著差異。在外源基因水平轉移風險評估方面，共檢測 2,052 個菌落，皆未檢測出有外源基因 *npt*II 的水平轉移情形。CLPP 參數經群集分析及生物多樣性分析結果顯示，pflp 轉殖系對根圈土壤微生物群落多樣性及均勻度沒有顯著影響。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會科技計畫 104 農科-6.3.2-農-C1 計畫經費支援，以及中研院馮騰永研究員提供香蕉轉殖系作為試驗材料，謹申謝忱。

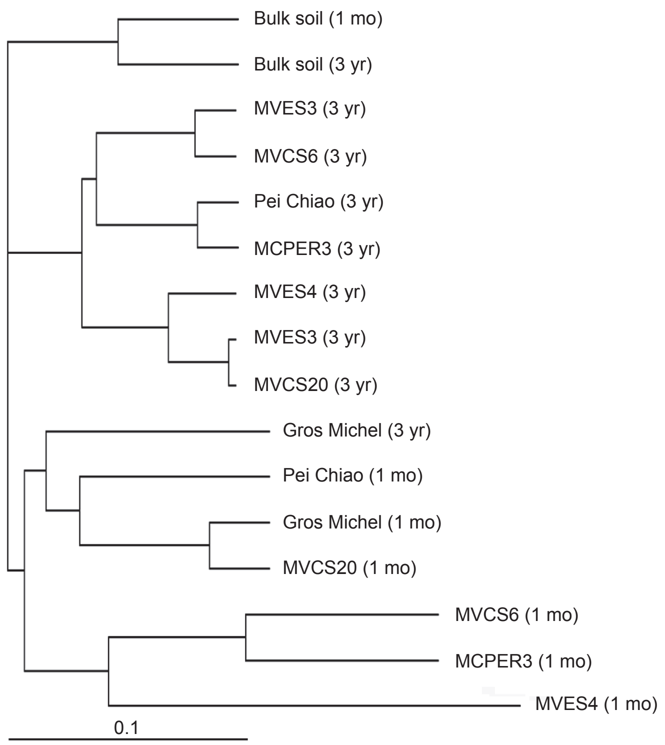


圖 3. 根圈土壤微生物樣品之群集分析。

Fig. 3. Cluster analysis using Jaccard coefficients of similarity and weighted pair groups for different rhizosphere soil samples. Similarity was analyzed using the Past3 and TreeView software. The soil samples were collected from the rhizosphere of different banana lines 1 mo and 3 yr after transplanting. Bulk soil samples were collected outside the rhizosphere of banana plants. Scale bar indicates percentage of similarity.

引用文獻

Amann, R. and W. Ludwig. 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. FEMS Microbiol. Rev. 24:555–565.

Angle, J. S. 1994. Release of transgenic plants: Biodiversity and population-level considerations. Mol. Ecol. 3:45–50.

Battraw, M. J. and T. C. Hall. 1990. Histochemical analysis of CaMV 35S promoter-beta-glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. Plant Mol. Biol. 15:527–538.

Benfey, P. N. and N. H. Chua. 1989. Regulated genes in transgenic plants. Science 244:174–181.

Chan, L. F., H. Y. Lu, C. T. Lu, and M. L. Wei. 2004. Risk assessment procedures and methods of the safety of transgenic crops. J. Agric. Sci. 52:120–130. (in Chinese with English abstract)

Dayakar, B. V., H. J. Lin, C. H. Chen, M. J. Ger, B. H. Lee, C. H. Pai, D. Chow, H. E. Huang, S. Y. Hwang, M. C. Chung, and T. Y. Feng. 2003. Ferredoxin from sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) intensifying harpinpass-mediated hypersensitive response shows an enhanced production of active oxygen species (AOS). Plant Mol. Biol. 51:913–924.

de Vries, J., P. Meier, and W. Wackernagel. 2001. The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. FEMS Microbiol. Lett. 195:211–215.

Fang, M., R. J. Kremer, and P. P. Motavalli. 2005. Bacterial diversity in rhizospheres of non-transgenic and transgenic corn. Appl. Environ. Microbiol. 71:4132–4136.

FAOSTAT. 2016. Food and agriculture organization statistics data. http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E (visited on 5/4/2016)

Heinemann, J. A. and T. Traavik. 2004. Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. Nat. Biotechnol. 22:1105–1109.

Heslop-Harrison, J. S. 2011. Genomics, banana breeding and super domestication. Acta Hort. 897:55–61.

Kawabe, A. and N. T. Miyashita. 2003. Patterns of codon usage bias in three dicot and four monocot plant species. Genes Genet. Syst. 78:343–352.

Lu, Y., C. P. He, W. H. Wu, and Z. W. Fan. 2008. Effect of transgenic banana plants on the microorganism in the soil. Chinese J. Trop. Crops 29:38–41. (in Chinese with English abstract)

Meier, P. and W. Wackernagel. 2003. Mechanisms of homology-facilitated illegitimate recombination for foreign DNA acquisition in transformable *Pseudomonas stutzeri*. Mol. Microbiol. 48:1107–1118.

Mislivec, P. B., L. R. Beuchat, and M. A. Cousin. 1992. Yeast and molds. p.239–249. *in*: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. (Vanderzant, C. and D. S. Splittoesser, eds.) AJPH Pub. New York. 1219 pp.

Nardi, S., G. Concheri, D. Pizzeghello, A. Sturaro, R. Rella, and G. Pavoli. 2000. Soil organic matter mobilization by root exudates. Chemosphere 5:653–658.

Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170:265–270.

Nicolia, A., A. Manzo, and F. Veronesi. 2014. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. Crit. Rev. Biotechnol. 34:77–88.

Nielsen, D. M., A. M. Bones, K. Smalla, and J. D. van Elsas. 1998. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacterial- A rare event? FEMS Microbiol. Rev. 22:79–103.

Nimusiima, J., M. Köberl, J. B. Tumuhairwe, J. Kubiriba, C. Staver, and G. Berg. 2015. Transgenic banana plants expressing *Xanthomonas* wilt resistance genes revealed a stable non-target bacterial colonization structure. Sci. Rep. 5. doi:10.1038/srep18078.

Philippot, L., J. M. Raaijmakers, P. Lemanceau, and W. H. van der Putten, L. 2013. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. Nat. Rev. Microbiol. 11:789–799.

Pontiroli, A., M. T. Ceccerini, and J. Pote. 2010. Long-term persistence and bacterial transformation potential of transplastomic plant DNA in soil. Res. Microbiol. 161:326–334.

Shannon, C. E. and W. Wiener. 1963. The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press. Urbana, IL. 125 pp.

Shin, L. J., H. E. Huang, H. Chang, Y. H. Lin, T. Y. Feng, and M. J. Ger. 2011. Ectopic ferredoxin I protein promotes root hair growth through induction of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. J. Plant Physiol. 168:434–440.

Somers, E., J. Vanderleyden, and M. Srinivisam. 2004. Rhizosphere bacterial signaling: A love parade beneath our feet. Crit. Rev. Microbiol. 30:205–240.

Swennen, R. and D. Vuylsteke. 1993. Breeding Black Sigatoka resistant plantains with a wild banana. Trop. Agric. 70:74–77.

Teather, R. M. and P. J. Wood. 1982. Use of congored-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. 43:777–780.

Ting, M. Y., H. D. Shih, and C. Y. Lin. 2008. Increased susceptibility of rice following insertion of amylopullulanase gene, to brown spot caused by *Bipolaris oryzae*. J. Phytopathol. 156:530–533. (in Chinese with English abstract)

Trevors, J. T., P. Kuikman, and B. Watson. 1994. Transgenic plants and biogeochemical cycles. Mol. Ecol. 3:57–64.

Wakabayashi, S., H. Matsubara, and D. A. Webster. 1986. Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. Nature 322:481–483.

Wang, B., W. Wang, H. J. Han, H. B. Hu, and H. F. Zhuang. 2012. Nitrogen removal and simultaneous nitrification and denitrification in a fluidized bed step-feed process. J. Environ. Sci. 24:303–308.

Yip, M. K., S. W. Lee, K. C. Su, Y. H. Lin, T. Y. Chen, and T. Y. Feng. 2011. An easy and efficient protocol in the production of *pflp* transgenic banana against Fusarium wilt. Plant Biotechnol. Rep. 5:245–254.

Biosafety Assessment of GM Banana: The Effect on Microflora Community in Rrhizosphere Soil

Han-Wei Chen[1], Jing-Wen Chen[2], Ching-Shan Tseng[1], Min-Tze Wu[3], and Yuan-Kai Tu[1,*]

Abstract

Chen, H. W., J. W. Chen, C. S. Tseng, M. T. Wu, and Y. K. Tu. 2017. Biosafety assessment of GM banana: The effect on microflora community in rrhizosphere soil. J. Taiwan Agric. Res. 66(2):134–145.

The environmental impacts on genetically modified (GM) crops are still unknown. This study aimed to explore the potential risk of pflp (plant ferredoxin-like protein) transgenic banana lines on rhizosphere microbial community and to investigate whether the gene flow occurs through horizontal gene transfer. The conventional plate counting method and the community-level physiological profiles (CLPP) method were used for evaluating rhizosphere microbial community. The results showed that most rhizosphere soil samples taken from pflp transgenic banana lines had reduced levels of *Azotobacteria* and nitrite oxidizing bacteria at respective 5.38–5.96 (log_{10} CFU g^{-1}) one month after transplanting. However, no significant difference was found in the quantity of culturable microorganisms in rhizosphere soils 3 years after transplanting. In this study, 2,052 colonies were analyzed for horizontal gene transfer, but no *npt*II fragment was detected. Results of cluster analysis for CLPP showed no difference between transgenic banana lines and their non-transgenic counterparts in microflora community composition. In addition, no significant difference was observed in species diversity and evenness of rhizosphere microorganisms between GM and non-GM banana plants. We conclude that pflp transgenic banana lines may not affect the diversity of rhizosphere microflora community structure, but have slight effects on microbial community in rhizosphere during first few months after transplanting.

Key words: Genetic modified crops, Biosafety assessment, Rhizosphere, Microflora community.

Received: May 20, 2016; Accepted: August 8, 2016.
[*] Corresponding author, e-mail: yktu@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Crop Improvement Division, Taitung District Agricultural Research and Extension Station, Taitung, Taiwan, ROC.
[3] Research Fellow and Director, Plant Technology Laboratories, Agricultural Technology Research Institute, Hsinchu, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(2):146–157 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06602.07

研究報告

利用不同培植體配合利巴韋林處理對蝴蝶蘭去病毒之影響

夏奇鋌[1] 陳金枝[2] 林南欣[3] 蔡媚婷[4,*]

摘要

夏奇鋌、陳金枝、林南欣、蔡媚婷。2017。利用不同培植體配合利巴韋林處理對蝴蝶蘭去病毒之影響。台灣農業研究 66(2):146–157。

本研究利用切取自短縮莖及擬原球體 (protocorm-like body; PLB) 之薄片培植體配合利巴韋林 (ribavirin) 不同濃度與處理時間進行蝴蝶蘭去病毒研究。試驗材料為確知感染蕙蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*; CymMV) 之蝴蝶蘭「台農1號小精靈」組織培養瓶苗，以瓶苗去葉後之短縮莖切取厚約1 mm薄片作為培植體，將薄片培植體置入含有不同濃度 ribavirin 之液體培養基中震盪培養 1–5 d 後，移至不含 ribavirin 之固體培養基中培養；或將薄片培植體於含有較低濃度 ribavirin 之固體培養基中持續培養一代或二代，培養期間除調查培植體的存活率外，當長出之小芽其葉片或根長度達 1 cm 以上時，切取其葉片或根以間接式酵素連結免疫吸附反應法 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; Indirect-ELISA) 進行病毒檢測，其中 ELISA 檢測呈陰性反應之芽體續以反轉錄核酸聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) 進行檢測。試驗結果顯示，以 250 mg L^{-1} ribavirin 液體培養 1 d 以上即明顯降低培植體之成活率；ribavirin 濃度降至 25–75 mg L^{-1} 之間處理 1–5 d，則不具去病毒之效果；但若於 50 mg L^{-1} ribavirin 液體培養基中浸泡 2 d 後，再繼代於含有 25 mg L^{-1} ribavirin 之固體培養基中繼續 8–12 wk 培養，去病毒率為 26.7%。此外，切取自短縮莖與切取自 PLB 之薄片培植體於低濃度 (12.5–37.5 mg L^{-1}) ribavirin 固體培養基中進行二階段培養，短縮莖與 PLB 培植體之去病毒率最高分別為 29.2% 及 22.2%，但 PLB 薄片培植體之對照組 (未施用 ribavirin) 去病毒率可高達 100%。綜合本研究之結果，建議採用具有高再生能力之培植體，以對植物細胞毒傷害較小但具抑制病毒增生之低濃度 ribavirin 配合繼代處理，具有提高去病毒之效果。

關鍵詞：蘭科植物、薄層細胞培養、擬原球體。

前言

蝴蝶蘭為台灣農業之旗艦產業，但蝴蝶蘭產業競爭激烈，近年來無病毒種苗已經成為國際間品質競爭之選項，但由於有些品種在幼苗期的病毒病徵表現不明顯，導致無法於第一時間發現並移除病株。此外，業界普遍採用之分生苗繁殖系統，在增殖的過程中若缺乏管控，也是導致種苗感染病毒的另一途徑。我國於2006年公告實施蝴蝶蘭種苗病毒驗證制度，業界對種苗病毒之管控普遍有共識，亦即欲進行組織培養繁殖之蘭株必須先經過病毒檢測程序，在確定不帶病毒後方能大量繁殖。惟蝴蝶蘭長期採用無性繁殖，許多早期流通之優良品種，因為受到病毒感染而退出市場者不在少數。此外，對於一些作為育種親本之非商業品種，在長期栽培後一旦受到病毒感染，珍貴種原就此消失，影響蝴蝶蘭育種工作的進行，殊為可惜。上述之感染病毒株若能利用去病毒技術重新活化，應可增加產業之競爭力。

投稿日期：2016 年 8 月 15 日；接受日期：2016 年 9 月 23 日。
* 通訊作者：wttsai65@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所花卉研究中心研究助理。台灣 雲林縣。
[4] 農委會農業試驗所花卉研究中心聘用副研究員。台灣 雲林縣。

臺灣農業研究66(2) 07-蔡媚婷.indd 146 2017/6/14 下午 04:33:47

感染蘭科植物之病毒眾多，包括蕙蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*; CymMV)、齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*; ORSV)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) 及番椒黃化病毒 (*Capsicum chlorosis virus*; CaCV) 等 (Zheng *et al*. 2011)，其中又以 CymMV 與 ORSV 兩種病毒最為普遍，對產業造成的影響亦最為嚴重，此兩者亦為國際間共識需檢測之病毒種類。台灣的病毒檢測技術發展相當進步，常用之檢測技術包括酵素連結抗體免疫吸附檢測法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)、反轉錄核酸聚合酶連鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) 和生物晶片 (biochip) 等 (Chang 2006)。在應用上掌握已知病毒之種類並具備敏感專一的病原檢定方法，是去病毒工作進行的基礎，而如何利用高效率的繁殖系統配合適當之去病毒處理，則是提高去病毒效率的重要關鍵 (Miloševi *et al*. 2012; Panattoni *et al*. 2013)。

常用之去病毒方法包括組織培養 (*in vitro*)、溫度處理 (thermotherapy)、化學藥劑處理 (chemotherapy)、冷凍處理 (cryotherapy) 以及上述方法的綜合處理 (Panattoni *et al*. 2013)。蘭科植物很早就被發現利用莖頂培養可以得到無病毒之種苗 (Morel 1960)，但取生長點需要較高的操作技巧，且生長點的培養效率偏低是其缺點 (Kang *et al*. 2011)。Jensen (1951) 則指出，單獨使用熱療法無法有效去除蕙蘭屬 (*Cymbidium*) 植物的嵌紋病毒 (Mosaic virus)；冷凍去病毒處理目前仍以種原保存為主要目的，在產業應用的實例較少 (Wang & Valkonen 2012)；這些去病毒方法中以組織培養方法如生長點、莖頂、擬原球體 (protocorm-like body; PLB) 等配合去病毒藥劑利巴韋林 (1-β-D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide; ribavirin，俗稱病毒唑) 處理最常被採用 (Albouy *et al*. 1988; Lim *et al*. 1993; Toussaint *et al*. 1993; Poter & Kuehnle 1997; Miloševi *et al*. 2012; Chien *et al*. 2015)。

薄層 (片) 培養 (thin cell layer; TCL) 最初是為研究細胞形態分化發展出之培養技術，在菸草、百合及菊花等模式植物已建立有完備之研究基礎 (Nhut *et al*. 2003)。此技術具有材料需求量少、繁殖速率快、繁殖效能高等優點，因此除了作為學術研究外，亦被廣泛應用於各種作物的微體繁殖。利用 TCL 方法於蝴蝶蘭繁殖的研究並不多見，Park *et al*. (2002) 以蝴蝶蘭花梗芽之幼葉作為薄片培植體誘導 PLB 產生，證實 TCL 技術亦適用於蝴蝶蘭的繁殖。Lim *et al*. (1993) 利用單莖雜交蘭 *Mokara* Char Kuan 'Pink' 莖頂 (0.1–1.0 mm) 培植體以及切取自芽體或 PLB 之薄片培植體配合 ribavirin 處理，比較兩種培植體之去病毒效果。結果顯示，只有較大之莖頂 (0.5 mm 以上) 培植體可以成活，但其再生植株仍受病毒感染，相反的，切取自芽體或 PLB 之薄片培植體配合 10 或 20 mg L^{-1} ribavirin 處理後，其 CymMV 之去病毒率可達 100%。

本研究以確認感染 CymMV 之蝴蝶蘭「台農 1 號小精靈」為材料，以切取自瓶苗短縮莖的薄片培植體配合去病毒藥劑 ribavirin 之使用，探討 ribavirin 使用濃度及其處理時間對去病毒效率之影響，並比較切取自短縮莖及 PLB 之薄片培植體培養於含有 ribavirin 之固態培養基中進行二階段處理對於去病毒效率之影響。

材料與方法

植物材料

選用確認感染 CymMV 之蝴蝶蘭「台農 1 號小精靈」(*Phalaenopsis* Tariflor Pixie 'Tainung No.1 Pixie') 組培瓶苗，瓶苗約 3–4 片葉，將瓶苗去葉後取長約 1 cm 之短縮莖，切取厚度約 1 mm 之短縮莖薄片作為培植體。此外，將薄片培植體長出之 PLB 加以繁殖，取大小約 3 mm 之 PLB 橫切成兩半作為 PLB 薄片培植體。

培養基配製及培養環境

薄片培植體之培養基共 2 種，培養基 A 成分為 1/2 MS (Murashige & Skoog 1962) 基礎鹽類添加 2 mg L^{-1} 腺嘌呤 (adenine)、1 g L^{-1} 蛋白腖 (peptone)、100 mL L^{-1} 椰子水、20 g L^{-1} 蔗糖，固體培養基另添加 3 g L^{-1} 水晶洋菜。

培養基 B 除上述成分外另添加 1 mg L^{-1} 6- 苄甲基腺嘌呤 (N6-benzyladenine; BA) 及 0.2 mg L^{-1} 萘乙酸 (1-naphthaleneacetic acid; NAA)，固體培養基則另行添加 6 g L^{-1} 洋菜 (惠光公司，台灣)。培養基於滅菌前將 pH 值調整為 5.7，以殺菌釜於 121℃ (1.1 kg cm^{-2}) 滅菌 25 min。滅菌後之培養基於凝固前分裝至直徑 6 cm 及 9 cm 無菌塑膠培養皿，分別裝入 12.5 mL 及 25 mL 之培養基。ribavirin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) 母液以 0.22 μm 微孔濾膜過濾除菌，再依所需濃度取適量加入滅菌後之液體培養基或未凝固之固態培養基，搖勻後分裝。培植體接種後於 25℃ ± 1℃、光週期為 14 h、光強度為 38 μmol m^{-2} s^{-1} 環境中培養。

高濃度 ribavirin 浸泡天數處理

將短縮莖薄片培植體置於含 250 mg L^{-1} ribavirin 之液體增殖培養基 B 中，於黑暗下以 100 rpm 水平式震盪培養 1、2 及 4 d 後，以無菌水清洗，將薄片培植體移植至固體增殖培養基 B，置於光照環境下培養。對照組為未經 ribavirin 處理之薄片，直接將薄片培植體接種於固體培養基 B 上，於光照環境下培養。每個直徑 6 cm 之培養皿置放切取自 1 個短縮莖之薄片培植體 (約 6–8 片)，每處理使用 7 個短縮莖，培養 4 wk 與 8 wk 後調查培植體之存活率。存活培植體之定義如圖 1 所示，培植體上長出之各種芽體 (圖 1A–D)、PLB (圖 1E–F)、癒傷組織 (圖 1G–H)，或是培植體無再生情形但亦未褐化者 (圖 1I)，以上情形皆視為存活；培植體已褐化或是白化且無任何再生情形者 (圖 1J–L) 則視為未存活。培植體存活率以存活之薄片培植體數除以原始培養之薄片培植體總數之百分比表示。

Ribavirin 濃度配合浸泡天數處理

將短縮莖薄片培植體分別置於含有 25、50 及 75 mg L^{-1} ribavirin 之液體培養基 A 中，於黑暗下以 75 rpm 水平震盪培養 1、2 及 5 d 後，繼代至不含 ribavirin 固體之培養基 A 中

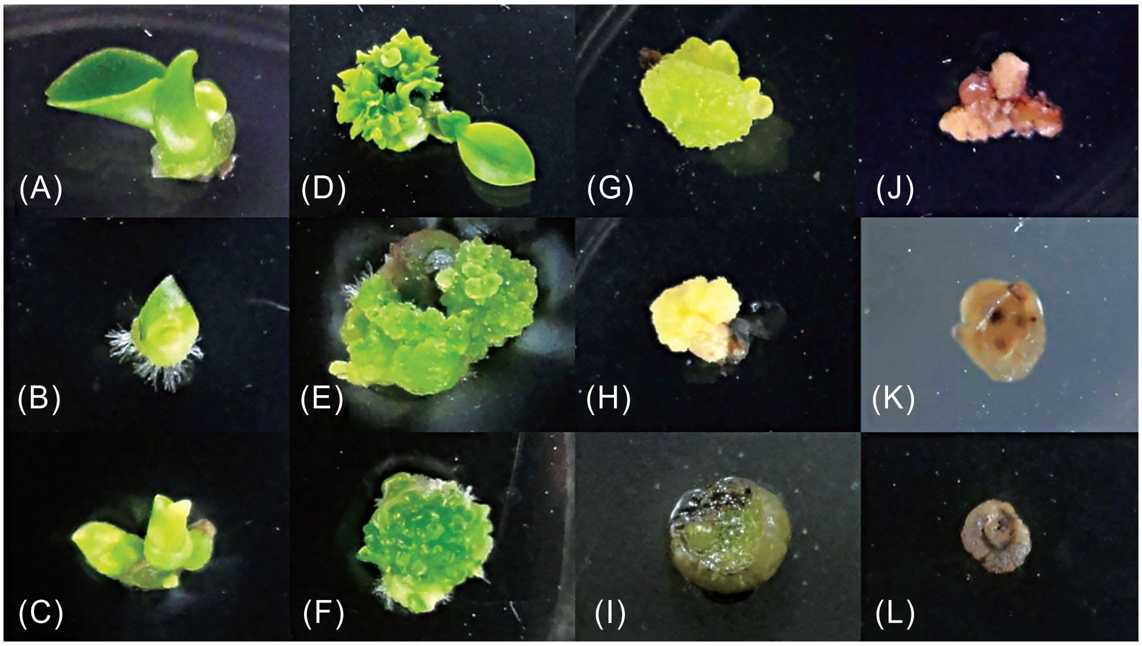


圖 1. 存活及未存活培植體之樣態。芽體 (A–D)、擬原球體 (E–F)、癒傷組織者 (G–H)，無再生情形但亦未褐化者 (I) 皆視為存活；已褐化、白化且無任何再生情形者 (J–L) 則視為未存活。

Fig. 1. Identification of survival and non-survival explants. Explants with regenerated shoot (A–D), protocorm-like body (E–F), callus (G–H) or explants remaining greenish without any type of regeneration were all counted as survival explants. Browning or whitening explants without regeneration (J–L) were counted as non-survival explants.

之後，置於光照環境下培養。對照組為未經 ribavirin 處理之薄片培植體，直接接種於不含 ribavirin 之固體 A 培養基，於光照環境下培養。每一直徑 6 cm 之培養皿中置放切取自 1 個短縮莖之薄片培植體 (約 6–8 片)，每一個處理共使用 15 個短縮莖，培養 4 wk 及 8 wk 後調查培植體之存活率，存活培植體之定義及計算方式同上述。

Ribavirin 浸泡後接種於降低濃度 ribavirin 固態培養處理

將短縮莖薄片培植體置於含 50 mg L^{-1} ribavirin 液體培養基 A 中，於黑暗下以 75 rpm 水平震盪培養處理 2 d 後取出，將培植體分別繼代至分別含有 0、12.5 及 25 mg L^{-1} ribavirin 之固體培養基 A 中，於光照環境下培養。每一直徑 9 cm 之培養皿中置放切取自 3 個短縮莖之薄片培植體，每一個處理共使用 15 個短縮莖，培養 4、8 及 12 wk 後調查培植體之存活率，存活培植體之定義及計算方式同上述。

不同來源培植體於含有不同濃度 ribavirin 之固態培養基中進行二階段處理

切取自短縮莖及 PLB 之薄片培植體第一階段培養於含有 12.5、25.0 或 37.5 mg L^{-1} ribavirin 之固體培養基 A 中，培養 8 wk 後將同一濃度處理其中一半之培植體繼代至不含 ribavirin 之培養基中培養，將另一半之培植體繼代至含有 12.5 mg L^{-1} ribavirin 之培養基中培養。對照組為培植體持續培養於不含 ribavirin 之固體培養基 A 中。直徑 6 cm 之培養皿置放切取自 3 個短縮莖之薄片培植體，每處理接種 8 皿共使用 24 芽；或每皿置放切取自 4 個 PLB，每個 PLB 切成 2 片之薄片培植體，每處理接種 9 皿共使用 36 個 PLB。

病毒檢測分析

因培植體在 ribavirin 不同濃度及不同處理時間後，其上長出各種芽體 (圖 1) 所需之時間並不相同，因此病毒檢測之取樣時間以芽體發育至帶有 1 片 1 cm 以上長度之葉片或根時進行，切取 1 cm × 1 cm 之葉片，或 1 cm 長度之根 (鮮重 50 mg 以上) 做為病毒檢測樣品，先以 ELISA 法進行病毒檢測，ELISA 呈現陰性反應之檢測樣品進一步以 RT-PCR 法進行病毒檢測，兩種方法皆未檢測出 CymMV 病毒者視為無病毒植株，去病毒率以 RT-PCR 未檢出之芽體數除以各處理原始使用芽體數之百分比表示。

酵素連結免疫吸附反應：本研究採用 indirect ELISA 法進行 CymMV 及 ORSV 之檢測 (Chang *et al*. 1988; Chen *et al*. 2013)。反應步驟如下：(1) 罹病組織覆膜反應：取新鮮葉片 0.1 g 磨碎，加入 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 混合，取組織液添加於 96 孔 ELISA 反應盤中 (100 μL 孔$^{-1}$)，每樣品 2 個重複，置於 37℃生長箱 4 h (或 4℃隔夜)；然後以 1× PBST (137 mM NaC1, 1.5 mM KH_2PO_4, 1 mM Na_2HPO_4, pH 7.4, 0.05% Tween 20) 沖洗 3 次；(2) 與受測病毒之抗體反應：分別以自製 (Chen *et al*. 2010) 之 CymMV 及 ORSV 抗體的免疫球蛋白 (IgG) 之 1,000× 稀釋反應液，添加於各反應孔中 (100 μL 孔$^{-1}$)，於 25℃定溫反應 3–4 h (或 4℃隔夜)，之後以 1× PBST 沖洗 3 次；(3) 與二次抗體反應：加入已稀釋 6,000× 之鹼性磷酸酶酵素連結山羊抗兔IgG (AP-conjugate goat anti-rabbit immunoglobulin, Jackson, West Grove, PA, USA) 於各反應孔中 (100 μL 孔$^{-1}$)，置於 25℃之定溫箱反應 3–4 h；再以 1× PBST 沖洗液沖洗 3 次；(4) 呈色反應：加入濃度為 1 mg mL^{-1} 之鹼性磷酸酶酵素基質 (p-Nitrophenyl phosphate; p-NPP) (Amresco, Solon Ind., Ohio, USA)，150 μL 孔$^{-1}$，反應 30–40 min，以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值。樣品吸光值高於健康葉片吸光值兩倍者，判讀為病毒正反應。

反轉錄-聚合酶鏈鎖反應：本試驗進行步驟如下：(1) 罹病植物組織全量核酸之純化-本試驗依據商業化植物核酸微量萃取試劑組 (Plant Total RNA mini Kit, Viogene, Viogene-BioTek Corporation, Taipei, Taiwan) 之步驟進行供試植物全量核醣核酸 (ribonucleic acid; RNA) 之萃取；(2) 以植物全量 RNA 為模版，利用

CymMV-163u/CymMV-589d 和 ORSV-229u/ORSV-449d 引子對分別於個別之反應管中進行 CymMV 及 ORSV 之 RT-PCR 反應，預估可獲得病毒核酸片段大小分別為 CymMV 427 bp，以及 ORSV 221 bp 之增幅產物。RT-PCR 以商業化單步驟 RT-PCR 試劑組 (GeneMark Co., Ltd., Taipei, Taiwan) 進行反應，於總體積為 25 µL 之反應管中混合下列成分：1 µL RNA、5 µL 之 5× RT Reaction Mix、5 µL 之 5× Enhancer、0.5 µL 之 RT Enzyme mix、0.1 µL RNase Block、11.4 µL 之 Nuclease free water、10 µM 之受測病毒引子各 1 µL，於熱循環反應儀 (Biometra T3000 Thermocycler, Germany) 中進行。反應條件為 50℃下進行反轉錄反應 30 min，再以 94℃下變性 2 min，所獲得之反轉錄核酸繼續進行 PCR 反應，條件為 94℃下變性 15 s，60℃下煉合 15 s，72℃下聚合 30 s 為一循環，共進行 30 個循環，最後一個步驟以 72℃聚合 4 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析。

結果

高濃度 ribavirin 浸泡天數處理

切取自蝴蝶蘭短縮莖之薄片培植體於含有 250 mg L^{-1} ribavirin 之液體培養基中震盪培養 1、2 及 4 d 後，繼代至不含 ribavirin 之固態培養基中培養，薄片培植體在 4 wk 及 8 wk 培養後之培植體存活率如表 1 所示。未經 ribavirin 處理之對照組 (0 d) 培植體在培養 4 wk 與 8 wk 後之存活率變化不大，皆在 81% 以上。但處理組之培植體隨著 ribavirin 處理天數增加至 2 及 4 d 時，存活率隨之下降，且觀察培植體 8 wk 之存活率較 4 wk 為低，顯示 ribavirin 雖然短時間 (1–4 d) 處理，但對培植體後續的生長仍具有不良影響。Ribavirin 處理 2 d 之培植體在培養 8 wk 時其存活率不及對照組之一半；處理 4 d 之培植體，在培養 4 wk 後已大部分呈現褐化現象，存活率僅 3.6%，但在 8 wk 培養後有少數褐化之培植體上分化出癒傷組織，因此存活率略提高至 5.4%。對照組處理獲得之總芽數為 52 芽，ribavirin 1 d 處理組獲得總芽數為 66 芽，顯示 ribavirin 1 d 處理並未造成芽數之減少；但延長處理天數至 2 與 4 d，兩處理組之芽數降低為 33 芽與 4 芽。病毒檢測的結果顯示，只有 ribavirin 2 d 處理組在 33 個芽體中有 5 個芽體呈 ELISA 陰性反應外，其他所有處理之芽體全數為 CymMV 正反應。此外，從 ribavirin 各處理之 ELISA 平均檢測值來看，ribavirin 1、2 及 4 d 處理 CymMV 之 ELISA 檢測值分別為 2.99–3.07，對照組則為 3.21。ELISA 檢測呈現陰性反應之 5 個芽體接續以 RT-PCR 方法檢測，結果皆呈現 CymMV 病毒正反應。

表 1. Ribavirin 250 mg L^{-1} 處理不同天數對蝴蝶蘭「台農 1 號小精靈」短縮莖薄片培植體之存活率及去病毒率之影響。

Table 1. Effects of 250 mg L^{-1} ribavirin with various incubation days on thin stem section explant survival and virus elimination of *Phalaenoposis* Tariflor Pixie ‘Tainung No. 1 Pixie’.

	Explant survival (%)		ELISA detection		
				CymMV OD value[y]	
Treatment (d)	4 wk	8 wk	Virus undetectable (%)	+	-
0	84.4 ± 10.3 a[z]	81.3 ± 8.7 a	0.0 (0/52)	3.21 ± 0.24 (52)[x]	-- (0)
1	78.1 ± 16.0 a	63.8 ± 18.5 b	0.0 (0/66)	2.99 ± 0.29 (66)	-- (0)
2	57.3 ± 24.1 b	37.9 ± 18.1 c	15.2 (5/33)	3.07 ± 0.36 (28)	0.04 ± 0.02 (5)
4	3.6 ± 6.1 c	5.4 ± 9.8 d	0.0 (0/4)	3.07 ± 0.24 (4)	-- (0)

[z] Means within a column followed by different letter(s) are significantly different at $P \leq 0.05$.
[y] OD value twice larger than that of healthy plant is defined as virus detectable (+), OD value other than that is defined as undetectable (-).
[x] Value in parentheses represents number of tested samples.

Ribavirin 濃度配合浸泡天數處理

因為 250 mg L^{-1} ribavirin 濃度對培植體的生長有較大的抑制作用，導致存活率偏低 (表 1)，遂降低 ribavirin 濃度至 25、50 及 75 mg L^{-1} 配合不同浸泡天數進行處理，薄片培植體之存活率及病毒檢測結果如表 2 所示。在培養 4–8 wk 間，除了低濃度 25 mg L^{-1} 不同浸泡天數間 (1、2 或 5 d) 之存活率差異較小外，提高濃度至 50 mg L^{-1} 處理 5 d 者或 75 mg L^{-1} 處理 2 及 5 d 者，其 8 wk 培植體之存活率皆顯著降低，顯示 ribavirin 濃度與處理時間兩者對培植體之存活率有交互之影響。病毒檢測結果顯示，對照組與 ribavirin 各處理組總共 95 芽，經 ELISA 檢測皆呈 CymMV 正反應，且各處理 CymMV 之 ELISA 平均檢測值與對照組相較，並未呈現下降之趨勢。

Ribavirin 浸泡後接種於降低濃度 ribavirin 固態培養處理

上述試驗顯示將 ribavirin 濃度降低至 25–75 mg L^{-1} 配合短時間 1–5 d 之浸泡處理，並未能達到去病毒之效果，本試驗將切取自短縮莖之薄片培植體以 50 mg L^{-1} ribavirin 處理 2 d 後，繼代至不含 ribavirin 或分別含有 12.5、25.0 mg L^{-1} ribavirin 之固體培養基中持續培養，薄片培植體的成活率及 ELISA 檢測結果如表 3 所示。薄片培植體在添加 12.5 mg L^{-1} ribavirin 培養基中之存活率與對照組比較並無明顯差異，但繼代至含 25.0 mg L^{-1} ribavirin 12 wk 後之培植體其存活率則較對照組為低。病毒檢測的結果顯示，對照組檢測之 90 個芽體全數為 CymMV 正反應，而繼代至含有 12.5 mg L^{-1} ribavirin 固體培養基中持續培養者，其芽體經 ELISA 檢測，其病毒未檢出率為 30.4% (7/23)，但將 7 個 ELISA 未檢出病毒之樣品續以 RT-PCR 檢測，則皆呈現病毒正反應；繼代於含有 25.0 mg L^{-1} ribavirin 中持續培養獲得之芽體，其 ELISA 病毒未檢出率為 20.7% (19/92)，將 19 芽續以 RT-PCR 檢測，其中有 4 芽為負反應，以 RT-PCR 未檢出之芽體數除以處理原始使用之芽體數，計算出去病毒率為 26.7% (4/15)。經 RT-PCR 確認之無病毒株，出瓶後於溫室種植可正常開花 (圖 2A)，取植株之花苞、花瓣、花梗、下位葉片及根尖等部位組織進行 RT-PCR 檢測，結果皆為 CymMV 病毒負反應 (圖 2B)。

表 2. Ribavirin 濃度及處理天數對蝴蝶蘭「台農 1 號小精靈」短縮莖薄片培植體之存活率及去病毒率之影響。

Table 2. Effects of ribavirin concentration in combination with incubation days on thin stem section explant survival and virus elimination of *Phalaenopsis* Tariflor Pixie ‘Tainung No. 1 Pixie’.

		Explant survival (%)		ELISA detection	
					CymMV OD value[y]
Ribavirin (mg L^{-1})	Treatment (d)	4 wk	8 wk	Virus undetectable (%)	+
0	0	56.0 ± 21.0 a[z]	29.5 ± 16.4 a	0.0 (0/30)	3.09 ± 0.21 (30)[x]
	1	36.3 ± 14.3 b	22.1 ± 12.6 ab	0.0 (0/8)	3.09 ± 0.16 (8)
25	2	46.0 ± 21.1 ab	22.8 ± 14.8 a	0.0 (0/18)	3.12 ± 0.25 (18)
	5	50.3 ± 22.2 ab	23.4 ± 16.8 a	0.0 (0/5)	3.29 ± 0.07 (5)
	1	49.8 ± 21.3 ab	29.4 ± 14.9 a	0.0 (0/7)	3.32 ± 0.12 (7)
50	2	41.9 ± 19.7 ab	23.9 ± 12.8 a	0.0 (0/6)	3.36 ± 0.08 (6)
	5	22.0 ± 15.6 c	8.6 ± 9.0 c	0.0 (0/1)	3.26 ± 0.00 (1)
	1	54.2 ± 22.3 a	26.3 ± 13.4 a	0.0 (0/14)	3.06 ± 0.23 (14)
75	2	43.5 ± 21.2 ab	13.4 ± 10.8 bc	0.0 (0/5)	3.29 ± 0.07 (5)
	5	15.5 ± 12.5 c	11.5 ± 9.8 c	0.0 (0/1)	3.03 ± 0.00 (1)

[z] Means within a column followed by different letter(s) are significantly different at $P \leq 0.05$.
[y] OD value twice larger than that of healthy plant is defined as virus detectable (+).
[x] Value in parentheses represents number of tested samples.

表 3.　固態培養基中之 ribavirin 濃度對蝴蝶蘭「台農 1 號小精靈」薄片培植體之存活率及去病毒率之影響。

Table 3.　Effects of ribavirin concentration in solid culture medium on thin stem section explant survival and virus elimination of *Phalaenopsis* Tariflor Pixie 'Tainung No. 1 Pixie'[z].

Ribavirin (mg L^{-1})	Explant survival (%)			ELISA detection			RT-PCR undetectable (%)	Virus elimination (%)
	4 wk	8 wk	12 wk	Virus undetectable (%)	CymMV OD value[x] +	CymMV OD value[x] -		
0	48.8 ± 18.9 a[y]	33.8 ± 18.0 a	27.5 ± 17.6 a	0.0 (0/90)	3.22 ± 0.19 (90)[w]	-- (0)	-- (0)	-- (0)
12.5	39.3 ± 15.1 ab	29.3 ± 13.2 a	23.9 ± 16.4 ab	30.4 (7/23)	2.39 ± 0.90 (16)	0.25 ± 0.17 (7)	0 (0/7)	0.0 (0/15)
25.0	34.3 ± 14.7 b	23.9 ± 10.7 a	13.9 ± 12.7 b	20.7 (19/92)	3.09 ± 0.35 (73)	0.21 ± 0.18 (19)	21.1 (4/19)	26.7 (4/15)

[z] Explants were soaked in liquid medium containing 50 mg L^{-1} ribavirin for 2 days before subculture into the solid medium containing 0–25 mg L^{-1} ribavirin.
[y] Means within a column followed by different letter(s) are significantly different at $P \leq 0.05$.
[x] OD value twice larger than that of healthy plant is defined as virus detectable (+), OD value other than that is defined as undetectable (-).
[w] Value in parentheses represents number of tested samples.

不同來源培植體於含有不同濃度 ribavirin 固態培養基中進行二階段處理

將切取自短縮莖之薄片培植體或切取自 PLB 之薄片培植體，直接接種於含有 12.5、25.0 或 37.5 mg L^{-1} ribavirin 固體培養基中培養，8 wk 後將同一處理之培植體其中一半繼代至不含 ribavirin 培養基中培養，另一半則繼代於含有 12.5 mg L^{-1} ribavirin 培養基中培養。切取自短縮莖之薄片培植體長出之芽體先以 ELISA 檢測，反應為陰性之芽體續以 RT-PCR 檢測，結果如表 4 所示。從 ELISA 之 CymMV 未檢出率來看，所有處理的平均值在 11.4–56.7% 之間，CymMV 未檢出率最高者為 37.5/12.5 mg L^{-1} (第一階段/第二階段濃度) 處理組之 56.7%，將未檢出之芽體以 RT-PCR 檢測加以確認，結果顯示 CymMV 未檢出率以第一階段培養基中含有較高濃度之 37.5/0 mg L^{-1} ribavirin 處理組之 43.8% 為最高，其次為 12.5/12.5 mg L^{-1} ribavirin 處理組之 25%。以 RT-PCR 未檢出芽體數除以處理原始使用之芽體數計算去病毒率，結果仍以 37.5/0 mg L^{-1} 處理組之 29.2% 為最高，其次為對照組之 20.8%。

以 PLB 為培植體進行同上之試驗，結果如表 5 所示。CymMV 之未檢出率在 32.3–62.2% 之間，將 ELISA 未檢出之芽體續以 RT-PCR 檢測，未檢出率顯示以對照組之 46.9% 為最高，其次為 12.5/0 mg L^{-1} 與 12.5/12.5 mg L^{-1} 處理，分別為 41.7% 及 40%。以 RT-PCR 未檢出芽體數除以處理原始使用之芽體數計算去病毒率，仍以對照組去病毒率達 100% 最高，其次為 37.5/12.5 mg L^{-1} 處理之 22.2%。

討論

Ribavirin 是一種合成的核苷酸類似物，在細胞內形成磷酸化能抑制病毒 RNA 合成並阻止病毒的複製，是廣泛被使用的去病毒藥劑，但 ribavirin 使用之濃度及處理時間會影響其去病毒效果的表現 (Panattoni *et al*. 2013)。本研究試驗初期採用高濃度 ribavirin 250 mg L^{-1} 短時間 (1–4 d) 浸泡薄片培植體，雖然浸泡處理時間只有數天，但培植體之成活率受到很大之影響。250 mg L^{-1} 浸泡處理 2 d 之薄片培植體其成活率僅為對照組之一半，處理 4 d 之薄片培植體的成活率僅剩 5.36%。由處理組 ELISA 檢測值及 RT-PCR 之結果來看，ribavirin 250 mg L^{-1} 濃度短時間 (1–4 d) 處理並無明顯降低病毒之效果，但高濃度 ribavirin 對培植體細胞產生毒害作用，導致成活率降低，培植體的再生亦受到嚴重抑制，因此並不推薦。

將 ribavirin 浸泡濃度降至 25–75 mg L^{-1} 雖可改善藥劑對培植體生長毒害的影響，但

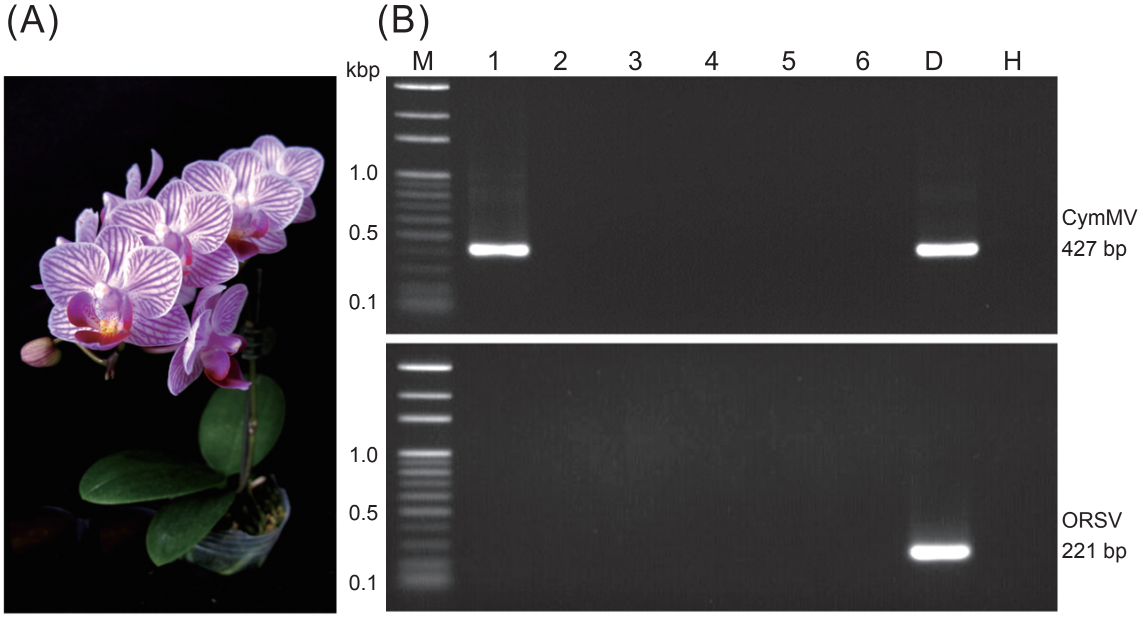


圖 2. 去病毒株開花情形 (A) 與利用 CymMV 及 ORSV 引子對於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應中檢測蘭花小精靈帶病毒母株及其去病毒株各部位組織之病毒反應 (B)。行 M：核酸分子量標幟；行 1，原病毒株；行 2–6，去病毒之各部位組織 (行 2：花苞；行 3：花朵；行 4：花梗、行 5：葉片；行 6：根)；行 D：罹病蘭花組織對照；行 H：健康蘭花組織對照。病毒引子對包括 CymMV-163u/CymMV-589d 及 ORSV-229u/ORSV-449d，可增幅出之個別病毒的核酸片段，預估分別為 CymMV 427 bp 和 ORSV 221 bp。小精靈帶病毒母株乃單獨 CymMV 感染株。

Fig. 2. Flowering of virus-disinfected plant of *Phalaenoposis* Tariflor Pixie 'Tainung No. 1 Pixie' (A) and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of virus-infected plant, or -disinfected tissues by the individual primers of CymMV and ORSV (B). Lane M: molecular marker; lane 1, the original CymMV-infected orchid; lane 2–6: CymMV-disinfected tissues from different parts of plant (lane 2: flower bud; lane 3: flower; lane 4: flower stalk; lane 5: leaf; and lane 6: roots); lane D: diseased orchid; and lane H: the healthy tissue of orchid. The predicted sizes of DNA fragments, amplified by the primer pairs CymMV-163u/CymMV-589d and ORSV-229u/ORSV-449d, were 427 bp for CymMV and 221 bp for ORSV, respectively. The CymMV-infected orchid stock was used in this study.

表 4. 連續固態培養基培養中之 ribavirin 濃度對蝴蝶蘭「台農 1 號小精靈」短縮莖培植體之存活率及去病毒率之影響。

Table 4. Effects of ribavirin concentration in consecutive solid culture medium on virus elimination of *Phalaenoposis* Tariflor Pixie 'Tainung No. 1 Pixie' using thin section explants derived from *in vitro* shoot stem.

Ribavirin (mg L^{-1})				
0–8 wk	9–12 wk	ELISA undetectable (%)	RT-PCR undetectable (%)	Virus elimination (%)
0	0	11.4 (5/44)	11.4 (5/44)	20.8 (5/24)
12.5	0	23.1 (3/13)	7.7 (1/13)	4.2 (1/24)
	12.5	41.7 (5/12)	25.0 (3/12)	12.5 (3/24)
25.0	0	6.7 (1/15)	0.0 (0/15)	0.0 (0/24)
	12.5	25.0 (4/16)	18.8 (3/16)	12.5 (3/24)
37.5	0	50.0 (8/16)	43.8 (7/16)	29.2 (7/24)
	12.5	56.7 (17/30)	13.3 (4/30)	16.7 (4/24)

表 5. 連續培養固態培養基中之 ribavirin 濃度對蝴蝶蘭「台農 1 號小精靈」擬原球體 (protocorm-like body; PLB) 薄片培植體存活率及去病毒率之影響。

Table 5. Effects of ribavirin concentration in consecutive solid culture medium on virus elimination of *Phalaenopsis* Tariflor Pixie 'Tainung No. 1 Pixie' using thin section explant derived from protocorm-like body (PLB).

Ribavirin (mg L^{-1})				
0–8 wk	9–12 wk	ELISA undetectable (%)	RT-PCR undetectable (%)	Virus elimination (%)
0	0	49.4 (40/81)	46.9 (38/81)	100 (38/36)
12.5	0	41.7 (5/12)	41.7 (5/12)	13.9 (5/36)
	12.5	60.0 (9/15)	40.0 (6/15)	16.7 (6/36)
25.0	0	37.5 (6/16)	18.8 (3/16)	8.3 (3/36)
	12.5	36.8 (7/19)	15.8 (3/19)	8.3 (3/36)
37.5	0	32.3 (10/31)	3.2 (1/31)	2.8 (1/36)
	12.5	62.2 (23/37)	21.6 (8/37)	22.2 (8/36)

3 種濃度在 1–5 d 的短時間處理下，各處理之 CymMV 檢測值並未下降 (表 2)，顯示 ribavirin 在這樣的濃度與時間之組合下，並未能有效抑制病毒的表現，且 ribavirin 濃度在 50 mg L^{-1} 以上，延長處理時間至 5 d 時，仍然嚴重影響培植體的存活率 (表 2)。Toussaint *et al*. (1993) 以蕙蘭 (Cymbidium) 之 PLB 以 35 mg L^{-1} ribavirin 進行連續多代液態培養去病毒試驗，報告中指出這個濃度可有效抑制病毒，但不致於對培植體產生毒害作用。在本研究中短縮莖薄片培植體以 ribavirin 處理之結果 (表 2) 亦可看出 ribavirin 濃度以及處理時間對薄片培植體成活率之影響，但推測因為薄片培植體對 ribavirin 之耐受時間較完整之 PLB 為低，且 ribavirin 採用之濃度與處理時間跟培植體及培養型式 (固、液體) 皆有相關，因此去病毒之效果亦不同。利用高濃度 (250 mg L^{-1}) 短時間浸泡嚴重影響培植體之生長，或降低濃度 (25–75 mg L^{-1}) 短時間浸泡處理，兩者皆未能有效去除病毒，遂思考採用以不影響培植體再生之較低濃度 ribavirin 進行長時間共同培養，亦即在固態培養基中提供低濃度 ribavirin 與培植體長期共同培養探討去病毒的可行性。

短縮莖薄片培植體在 50 mg L^{-1} ribavirin 浸泡 2 d 處理後，持續繼代培養在含有 12.5 及 25 mg L-1 ribavirin 之固態培養基中，結果分別有 30.4% (7/23) 及 20.7% (19/92) 之再生芽體其 ELISA 檢測呈現陰性反應 (表 3)，且 25 mg L^{-1} 處理 RT-PCR 未檢出率為 21.1% (4/19)，表示薄片培植體在低濃度 ribavirin 中持續培養，CymMV 病毒量的表現會受到抑制 (表 3)。延續培植體於低濃度 ribavirin 中持續培養具有抑制病毒之概念，但針對含有 ribavirin 培養基持續培養所需的時間加以比較 (表 4)。試驗結果顯示，ribavirin 濃度較低者如 12.5 或 25 mg L^{-1}，可延長培植體與 ribavirin 共培養時間，有利於提高去病毒率，但提高 ribavirin 濃度至 37.5 mg L^{-1} 時，是否延長 ribavirin 之培養時間，在本試驗中之短縮莖薄片培植體與 PLB 薄片培植體表現並不一致。綜合言之，雖然低濃度 ribavirin 對細胞的毒害作用之影響較小，但培養基中之 ribavirin 仍對芽體的再生造成影響，推測長時間施以低濃度 ribavirin 處理，雖有助降低病毒濃度，但對新生組織的生長會有不利之影響，必須加以考慮。Lim *et al*. (1993) 將單莖性雜交蘭 (*Mokara* Char Kuar 'Pink') 之 PLB 培養於低濃度 ribavirin (10–20 mg L^{-1}) 培養基中，經持續繼代亦能得到無病毒株。他並指出 ribavirin 藥劑的效果與其說是殺病毒 (virucidal) 不如說是抑制病毒 (virustatic)。本研究之結果與其論點相當吻合，因為短時間高濃度之 ribavirin 處理並無法穩定的去除病毒 (表 1 及 2)，反而是低濃度 ribavirin 持續培養有助於病毒量之降低 (表 3、4 及 5)，原因是 ribavirin 的存在主要在抑制病毒之增生而非殺死病毒，因此推測 ribavirin 使用之濃度只要能達到抑制病毒增生之門檻即可，提高 ribavirin 濃度必須考慮藥劑本身對植物細胞產生之毒對

培植體再生力的影響，進而影響到去病毒之效果。

去病毒效率受許多的因子的影響，如植物品種、病毒的種類、藥劑濃度與處理方式、培植體增殖率等 (Panattoni *et al*. 2013)。相同的去病毒方式使用在不同的繁殖系統中，去病毒的效果亦不同，主要原因在於若是病毒複製或移行速度不及細胞的分裂速度時，會有較多機會得到未受感染的再生芽體。從短縮莖切取而來之薄片培植體與切取自 PLB 之薄片培植體作比較，PLB 培植體因具有較高之再生率，有利於再生芽體逃避病毒的感染，這一點從短縮莖而來之培植體 (表 4) 與從 PLB 而來之培植體 (表 5) 在相同處理情況下，後者除 37.5/0 mg L^{-1} 處理組外，各處理之 ELISA 檢出率皆較低。顯示培植體本身的再生率對於去病毒效率之影響，尤其 PLB 培植體試驗中，對照組高達 100% 去病毒率表現 (表 5)，具體證明若培植體具有高再生能力，ribavirin 處理並非絕對必須。Li (2011) 研究指出以確認病毒感染之 PLB 進行增殖，發現 PLB 增殖團中感染 CymMV 病毒的比率為 78.04%，亦即由一顆 PLB 增殖出來之 PLB 增殖團塊，有 21.96% 的新生 PLB 尚未受到感染。晚近 Chien *et al*. (2015) 利用莖頂誘導而來之 PLB 作為去病毒材料，在繁殖的過程未使用任何去病毒藥劑處理，在 PLB 第 1 次繼代後即可獲得高達 68.75% (2/32) 之無病毒 PLB，也呼應了這樣的看法。Albouy *et al*. (1988) 將蕙蘭屬植物 (*Cymbidium*) 之 PLB 培養於含有 25 mg L^{-1} ribavirin 培養基中經過多次繼代，指出以較短的繼代時間 (18 d vs. 30 d) 更能提高去病毒效率，亦即將處於高繁殖狀態之新生 PLB 迅速與舊組織脫離，以 18 d 繼代一次之速率經 5 次繼代後，即有 95% 之新生 PLB 為 virus-free 植株。蘭科植物的繁殖系統會影響去病毒處理的效率，除了培植體再生能力的影響外，培植體的大小亦會影響藥劑之適用濃度 (Lim *et al*. 1993)。本研究切取自短縮莖的薄層培植體厚度僅 1 mm，培植體的細胞組織可以充分的與去病毒藥劑接觸，短縮莖的薄片培植體可取自瓶苗或花梗芽，不似取生長點需要顯微鏡設備及要求較高之培養條件。若已建立有 PLB 繁殖系統，則利用高再生力 PLB 作為去病毒培植體的材料效果更佳，如果使用較小之 PLB (< 3 mm) 可以簡單橫切成兩個培植體，培植體的厚度在 1–1.5 mm，對於體積較大之 PLB 建議仍以薄片方式切取培植體作為去病毒處理之材料，讓薄片培植體與含有抑制病毒之培養基有充分之接觸，抑制病毒的增生，且建議利用繼代培養儘早將新生 PLB 與舊組織分開，因為快速生長之新生組織逃脫病毒感染的機率相對較高。

綜合本研究結果來看，蝴蝶蘭去病毒之效率主要取決於培植體的生長速度，去病毒藥劑 ribavirin 之濃度只要達到能夠抑制病毒的增生的標準即可。且低濃度 ribavirin 可避免藥劑本身對植物細胞產生之毒害作用，以低濃度 ribavirin 配合長時間處理，利用繼代培養時將新生芽體與舊組織分離，達到去病毒的效果。換句話說，在病毒生長受到抑制的情況下，具有快速生長能力的新生組織藉由連續繼代有效的將新生組織與舊組織分開，可以提高得到未受病毒汙染新生組織之機會。這點可以從本研究中未曾使用 ribavirin 的 PLB 對照組，只靠迅速生長的新生組織，亦有機會在繼代後得到未被病毒感染之芽體得到證實。

引用文獻

Albouy, J., C. Flouzat, C. Kusiak, and M. Tronchet. 1988. Eradication of orchid viruse by chemotherapy from *in vitro* cultures of cymbidium. Acta Hort. 234:413–420.

Chang, C. A. 2006. Diagnosis, identification, and detection of orchid viruses. p.103–118. *in*: Proceedings of Workshop on Identification and Diagnosis of Iimportant Plant Pathogens (V). September 2006. Taipei, Taiwan. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, COA/Natl. Chung Hsing Univ., Taichung, Taiwan (in Chinese)

Chang, C. A., D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 1988. Characterization and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyviruses. Phytopathology 78:1266–1275.

Chen, C. C., J. Y. Lin, Y. H. Cheng, and F. L. Chiang. 2010. Distribution of *Odontoglossum ringspot virus*

on plant of *Cymbidium* spp. and its application on virus detection. Plant Prot. Bull. 52:17–24. (in Chinese with English Abstract)

Chen, C. C., Y. L. Jhang, B. Y. Lin, F. L. Chiang, Y. H. Cheng, and T. C. Deng. 2013. Serological reagent preparation and improvement of serological method to detect the *Plantago asiatica mosaic virus* in lily. J. Taiwan Agric. Res. 62:268–279. (in Chinese with English Abstract)

Chien, K. W., D. C. Agrawal, H. S. Tsay, and C. A. Chang. 2015. Elimination of mixed '*Odontoglossum ringspot*' and '*Cymbidium mosaic*' viruses from *Phalaenopsis* hybrid 'V3' through shoot-tip culture and protocorm-like body selection. Crop Prot. 67:1–6.

Jensen, D. D. 1951. Mosaic or black streak disease of *Cymbidium* orchids. Phytopathology 41:401–414.

Kang, F. Y., S. T. Hsu, and R. S. Shen. 2011. Virus elimination through meristem culture and rapid clonal propagation by temporary immersion system in *Phalaenopsis*. J. Taiwan Soc. Hort. Sci. 57:52–63. (in Chinese with English abstract)

Li, P. C. 2011. *In Vitro* Production of Virus-Free *Phalaenopsis* Orchids through Chemotherapy of Ribavirin and Multiplex RT-PCR Detection of *Capsicum chlorosis virus and Phalaenopsis chlorotic spot virus*. Master Thesis, Department of Plant Pathology, Natl. Chung Hsing Univ. Taichung, Taiwan. 50 pp.

Lim, S. T., S. M. Wong, and C. J. Goh. 1993. Elimination of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* from orchids by meristem culture and thin section culture with chemotherapy. Ann. Appl. Biol. 122:289–297.

Miloševi, S., A. Cingel, S. Jevremovi, I. Stankovi, A. Bulaji, B. Krsti, and A. Suboti. 2012. Virus elimination from ornamental plants using *in vitro* culture techniques. Pestic. Phytomed. 27:203–211.

Morel, G. 1960. Producing virus-free cymbidium. Amer. Orchid Soc. Bull. 29:495–497.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473–497.

Nhut, D. T., J. A. Teixeira da Silva, B. Van Le, and K. Tran Thanh Van. 2003. Thin cell layer morphogenesis as a powerful tool in ornamental plant micropropagation and biotechnology. p.247–284. *in*: Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications. (Nhut, D. T., B. Van Le, K. Tran Thanh Van, and T. Thorpe, eds.) Kluwer Academic. New York. 515 pp.

Panattoni, A., A. Luvisi, and E. Triolo. 2013. Elimination of viruses in plant: Twenty years of progress. Spanish J. Agric. Res. 11:173–188.

Park, S. Y., E. C. Yeung, D. Chakrabarty, and K. Y. Paek. 2002. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. Plant Cell Rep. 21:46–51.

Porter, K. G. and A. R. Kuehnle. 1997. Using dithiouracil and ribavirin to eliminate *cymbidium mosaic virus* during micropropagation of 'Uniwai Mist' Dendrobium orchid. HortTechnology 7:161–164.

Toussaint, A., J. Kummert, C. Maroquin, A. Lebrun, and J. Roggemans. 1993. Use of VIRAZOLE® to eradicate odontoglossum ringspot virus from *in vitro* culture of *Cymbidium* Sw. Plant Cell Tiss. Org. 32:303–309.

Wang, Q. C. and J. P. T. Valkonen. 2012. Cryotherapy of shoot tips: Novel pathogen eradication method. Trends Plant Sci. 14:119–122.

Zheng, Y. X., C. C. Chen, and F. J. Jan. 2011. Identification and characterization of three new *Phalaenopsis* orchid-infecting viruses. Acta Hort. 901:127–132.

Effect of Explant Type and Ribavirin Treatment on Virus Elimination of *Phalaenoposis* spp.

Chi-Ni Hsia[1], Chin-Chih Chen[2], Nan-Hsin Lin[3], and Wei-Ting Tsai[4,*]

Abstract

Hsia, C. N., C. C. Chen, N. H. Lin, and W. T. Tsai. 2017. Effect of explant type and ribavirin treatment on virus elimination of *Phalaenoposis* spp. J. Taiwan Agric. Res. 66(2):146–157.

This study was conducted to determine thin section explants derived from stem or protocorm-like body (PLB) in combination with ribavirin treatments on virus elimination of the *Cymbidium mosaic virus* (CymMV)-infected *Phalaenopsis* 'Tainung No. 1 Pixie'. Leafless *in vitro* shoots were cut into 1 mm thin sections as culture explants. Explants were soaked in liquid media containing various concentrations of ribavirin for less than 5 d culturing before culturing into the solid medium without ribavirin; or explants were cultured directly on solid media containing lower concentrations of ribavirin for one or consecutive culturing. Other than collecting survival rates of explants, leaves or roots which developed longer than 1 cm were cut out from regenerants for indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests. Samples reacted in negative by ELISA were tested further using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Results showed that high concentration of ribavirin (250 mg L^{-1}) suppressed explant survival as well as shoot regeneration significantly. However, lower concentrations of ribavirin (25–75 mg L^{-1}) for short duration were found not effective on virus elimination. A virus elimination rate of 26.7% was obtained from explants soaked in the liquid medium containing 50 mg L^{-1} ribavirin for 2 d before subculturing on the solid medium containing 25 mg L^{-1} ribavirin for 12-wk of culturing. Thin section explants cut from *in vitro* shoot stem or PLB were both cultured on the solid media containing 12.5–37.5 mg L^{-1} ribavirin for two consecutive culturing. The highest virus elimination rate derived from stem or PLB thin section explants were 29.2% and 22.2%, respectively. However, a virus elimination rate of 100% was obtained from the control PLB explants which treated without any ribavirin. In conclusion, in order to obtain an efficient virus elimination system, highly regenerable explants cultured in the medium containing low concentration of ribavirin with least cytotoxic effect on regenerable cell growth but with suppression on virus proliferation for consecutive cultures would be recommended.

Key words: Orchid, Thin cell layer culture, Protocorm-like body.

Received: August 15, 2016; Accepted: September 23, 2016.
[*] Corresponding author, e-mail: wttsai65@tari.gov.tw
[1] Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Research Assistant, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yunlin, Taiwan, ROC.
[4] Associate Research Fellow, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yunlin, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(2):158–166 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06602.08 研究報告

由 *Sclerotium rolfsii* 引起之甘藷白絹病

黃巧雯[1] 楊宏仁[2] 林靜宜[3] 許淑麗[4] 賴素玉[4] 柯文琪[4] 倪蕙芳[5,*]

摘要

黃巧雯、楊宏仁、林靜宜、許淑麗、賴素玉、柯文琪、倪蕙芳。2017。由 *Sclerotium rolfsii* 引起之甘藷白絹病。台灣農業研究 66(2):158–166。

甘藷白絹病為 2015 年陸續在彰化、雲林及屏東甘藷栽培田出現之嚴重病害。其主要病徵為藷塊上產生黃褐色圓型病斑，大多數病斑在甘藷採收後雖不會繼續擴大，但嚴重影響品質。由病組織所分離之病原菌，培養時產生白色菌絲，具有扣子體，並會產生褐色菌核 (brown sclerotia)，依據形態及分子鑑定為 *Sclerotium rolfsii* Sacc.。本菌於 15–35℃培養時菌絲均會生長，30℃為最適生長溫度。病原菌不僅在甘藷藷塊造成病斑，亦對葉用甘藷苗具有病原性，造成幼苗莖基部褐化，植株倒伏，枯死。測試 9 種殺真菌劑對本菌菌絲之生長抑制情形，結果顯示 50.0% 福多寧 (flutolanil)、75.0% 滅普寧 (mepronil)、7.5% 依普座 (epoxiconazole)、23.0% 菲克利 (hexaconazole) 及 25.0% 賓得克利 (pencycuron + btebuconazole) 在 10 mg a.i. L^{-1} 有效濃度下對其菌絲生長抑制率均可達 89.2% 以上。本文為國內第一篇闡明由 *S. rolfsii* 引起之甘藷白絹病並提供防治藥劑篩選結果之報告，可供農業研究人員參考。

關鍵詞：甘藷、白絹病、藥劑篩選。

前言

甘藷在台灣俗稱番藷，為旋花科 (Convolvulaceae) 植物，原產於熱帶美洲墨西哥，其後傳至熱帶亞洲及非洲等地，為熱帶及亞洲地區重要的飼料作物、糧食作物及工業原料 (Lai *et al*. 2008)。甘藷生長範圍廣，在南北緯 40 度及海拔 2,000 m 的地區均可生長，全世界超過 100 個國家生產甘藷，亞洲所生產之總量占 80% 以上 (Anonymous 1998)。目前全世界栽培面積約有 1,500 萬公頃，年產量達 1 億 3 千萬公噸。台灣以往最高生產面積為 1971 年間，曾達 20 萬公頃左右，其後逐漸減少，至 2004 年達最低，約 8,184 ha，2004 年以後甘藷種植面積維持在 9,500–10,600 ha 之間。2014 年統計年報顯示總計 70,565 ha，主要產區在雲林縣及台南市分別為 26,585 ha 及 10,838 ha (http://www.afa.gov.tw/Public/GrainStatistics/2015511838435334.pdf)。主要栽培品種為塊根用之「台農 57 號」及「台農 66 號」及葉菜用之「台農 71 號」及「桃園 2 號」等品種。

在台灣危害甘藷屬植物的病原紀綠有青枯病 (Southern wilt; *Ralstonia solanacearum*)、縮芽病 (Scab; *Elsinoe batatas*)、蔓割病 (Stem rot; *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas*)、軟腐病 (Soft rot; *Rhizopus stolonifer*)、黑腐病 (Java Black rot; *Lasiodiplodia theobromae*)、基腐病 (Stem rot; *Phomopsis destruens*)、簇葉病 (Witches' broom; ycoplasma-like organism)、病毒病 (Virus disease; *Leaf curl virus*, *Yellow*

投稿日期：2016 年 8 月 3 日；接受日期：2016 年 10 月 5 日。
* 通訊作者：hfni@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所研究員兼分所長。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所助理研究員。台灣 嘉義市。
[4] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系研究助理。台灣 嘉義市。
[5] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣 嘉義市。

spot virus, *Feathery mottle virus*, *Latent virus*) 等 (Shen 1992; Hsu *et al*. 2002; Wang 2007; Chen *et al*. 2012; Hung *et al*. 2012)。而近年來在田間常見甘藷於採收時，於藷塊上發生圓形凹陷褐斑，偶而於病徵上發現類似 *Sclerotium rolfsii* 之菌絲及菌核，藉由研究報告比對後發現可能為由 *S. rolfsii* 引起之甘藷 Circular spot 病害。已知國外報告中 *S. rolfsii* 亦會引起甘藷幼苗 southern blight，然於台灣並未見上述有關由 *S. rolfsii* 引起之甘藷白絹病研究報告 (Clark *et al*. 2013)。為進一步瞭解甘藷白絹病在田間發生之情形及確認病原菌種類，本研究於甘藷田間實際於採收時進行甘藷白絹病之發生率調查，並進行病原鑑定及室內防治藥劑篩選，期望能對本病害之防治有所助益。

材料與方法

甘藷白絹病之發生調查

本研究在 2015 年 2–3 月期間，分別於雲林縣水林鄉、屏東縣鹽埔鄉、彰化縣福興鄉等地進行秋作甘藷之調查；在 2015 年 9 月期間於台北市金山區及萬里區進行春作甘藷之調查；在 2015 年 11 月期間於彰化縣大城鄉進行夏作甘藷調查，調查方式為於採收時至田間隨機調查每個田區 200 個甘藷的白絹病發生率。

甘藷白絹病病原菌之分離與鑑定

將田間發病之病藷攜回實驗室，如發現病徵上有菌絲及菌核等病兆者，則直接挑取病原置於以乳酸 (lactic acid) 酸化 PDA (acidified PDA; APDA) 平板上 (pH 3.8)。其配製方法為將 50% (v/v) 乳酸溶液 750 µL 加入經滅菌後降溫到 55℃之 300 mL PDA (potato dextrose agar, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 中輕晃混勻，若無病兆者，則直接將罹病藷塊以 75% 酒精消毒陰乾後，切取病健部相鄰組織置於 APDA 培養基上分離，待長出菌絲後切取菌絲尖端移至 PDA 培養基上進行純化，並置於 10℃保存備用。本研究使用之 SCL-001 及 SCL-003 菌株為分別由台南市新化區及彰化縣福興鄉甘藷病藷所分離之菌株。此外，將所純化之病原置於 1.5% WA 培養 2 d 後，同時以顯微鏡 (Nikon, ECLIPSE 80i, Tokyo, Japan) 觀察其菌絲形態，並以數位影像系統 (NIS-Elements BR 3.0, Nikon, Japan)，進行拍照，並測量菌絲寬度。

為進行病原菌分子鑑定，將以 PDA 培養之 SCL-003 菌絲以 NaOH 進行核酸簡易萃取 (Wang *et al*. 1993)，再以用於增幅真菌 ITS 序列之通用性引子 ITS1 (5’TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’) 及 ITS4 (5’TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’) (White *et al*. 1990) 進行 PCR 增幅。進行核酸增幅反應時，使用 Bio-Rad iCycler Thermal cycler (Hercules, California, USA)，反應條件如下：94℃ 4 min；94℃ 30 s、52℃ 30 s、72℃ 30 s，共 30 個循環；72℃ 7 min，最後以 1.5% Agarose gel 0.5× TBE 緩衝液進行核酸電泳分析，並以無毒染劑 (EZ-Vision Three DNA Dye as Loading Buffer, Amresco, Pollster) 染色觀察。所得 PCR 產物再委託源資生物科技公司 (台北，台灣) 以 dideoxy termination 進行核酸定序，定序後之核酸序列利用美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 基因資料庫進行序列查詢與比對。

甘藷白絹病菌之病原性測試

將所分離之 SCL-003 菌株培養於 PDA 平板上 2 d，以直徑 5 mm 之打孔器將邊緣菌絲做成菌絲塊。將馬鈴薯塊莖、「台農 57 號」甘藷塊根、紅蘿蔔塊根等以酒精表面消毒後，以滅菌之解剖刀製造長寬約 10 mm，深約 1 mm 之傷口，再將上述菌絲塊接種至植物組織內，置於塑膠盒中保濕，並放置於 25℃之定溫箱中，逐日觀察病徵出現之情形，並記錄病斑直徑大小，每處理 5 重覆。另為將病原菌菌絲塊接種於「台農 71 號」之葉用甘藷扦插苗基部，並置於 30℃定溫箱中，逐日觀察植株是否有基部褐化，植株枯死之情形。

溫度對甘藷白絹病菌菌絲生長之影響

將供試菌株 SCL-003 移植至 PDA 平板並於 30℃定溫箱培養 2 d 後，以滅菌過孔徑 0.5 cm 之打孔器切取菌絲邊緣之菌絲塊，接種於

PDA 培養基平板上 (直徑 9 cm 之培養皿)。分別置於 15、20、25、30、35 及 40℃之定溫箱中黑暗培養，每處理 3 重複，於培養後第 1、3、7、10 及 20 d 測量菌落生長直徑。

化學藥劑對甘藷白絹病菌菌絲生長之影響

將供試菌株 SCL-001 及 SCL-003 移植至 PDA 平板並於 30℃定溫箱培養 2 d 後，以滅菌過孔徑 0.5 cm 之打孔器切取菌絲邊緣之菌絲塊供試，並利用藥劑平板測試法測定供試藥劑之抑菌效果。所使用 9 種藥劑及種類如下：10.0% 保粒黴素 (甲) WP (polyoxins，興農股份有限公司)、50.0% 撲滅寧 WP (procymidone，立農化學股份有限公司)、50.0% 福多寧 WP (flutolanil，日佳農藥股份有限公司)、50.0% 貝芬同 WP (carbendazim + iprodione，龍燈生物科技股份有限公司)、75.0% 滅普寧 WP (mepronil，庵原農藥股份有限公司)、7.5% 依普座 SC (epoxiconazole，巴斯夫股份有限公司)、21.0% 賽氟滅 SC (thifluzamide，惠光股份有限公司)、23.0% 菲克利 SC (hexaconazole，嘉泰企業股份有限公司) 及 25.0% 賓得克利 SC (pencycuron + tebuconazole，拜耳股份有限公司)，配製成含有效成分濃度為 1 mg a.i. L^{-1}、10 mg a.i. L^{-1}、100 mg a.i. L^{-1} 之 PDA 培養基，另以不添加藥劑之 PDA 平板作為對照。將上述直徑 0.5 cm 的菌絲塊，菌絲面朝下置入直徑 8.5 cm 之含藥的 PDA 培養基平板中央，置於 25℃之定溫箱中黑暗培養，待對照組菌絲長滿，測量其菌絲生長直徑，每處理 6 重複，本試驗重複進行 2 次。試驗結果按下列公式換算藥劑對菌絲之生長抑制率。抑制率 (%) = [(對照組平均生長直徑 − 藥劑處理組平均生長直徑)/ 對照組平均生長直徑] × 100%。

統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS 9.1 版統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗在 5% 顯著水準下，比較處理間平均值之異。

結果

甘藷白絹病之發生與病徵

本研究於甘藷採收期至雲林縣水林鄉西井村、海埔村、大溝村，彰化縣福興鄉，屏東縣鹽埔鄉等地進行逢機調查，結果顯示此些區域之秋作甘藷為「台農 57 號」，而白絹病之發生率為 0–53.0% 不等 (表 1)，依不同田區之管理不同而有差異。白絹病主要造成甘藷藷塊產生黃褐色圓型病斑，在採收後病斑大都不會繼續擴大，呈圓形壞疽斑 (圖 1A)。有些發病嚴重之田區，會在採收時之罹病藷週邊土上有明顯的白絹病菌絲及菌核 (圖 1B)。而春作及夏作甘藷大多為「台農 66 號」，就本研究所調查之資料顯示完全未調查到有發生白絹病之田區。

甘藷白絹病菌之培養形態、分子鑑定及病原性測試

甘藷白絹病菌培養於 PDA 平板，菌絲平鋪，呈白色絹絲狀，偶有氣生菌絲，於 30℃培養 1 wk 後會產生白色至褐色之球狀菌核，培養 21 d 後菌核大小約 0.8–1.5 mm (圖 1C)。本菌具有兩型菌絲，粗菌絲約寬 5.6–8.97 μm，細菌絲約寬 2.17–3.49 μm (圖 1D)，具有扣子體，此些特徵與 Mordue (1974) 所述之 *S. rolfsii* 相似。為進一步確認菌株鑑定之正確性，將 SCL-003 菌株之 ITS 片段序列純化定序後，並登錄於 NCBI 之 GenBank，其序列之 Accession number 為 KX186998。再利用多重序列比對分析菌株間之序列相同度，發現與 NCBI 上登錄之 *S. rolfsii* 菌株 (Accession No. HQ42086) 的 ITS 序列相同度均為 99%。為了進一步測定其病原性，本研究將培養於 PDA 平板之白絹病菌菌絲塊接種於甘藷藷塊，並置於定溫箱中保濕，於接種 2 d 後，藷塊接種點開始出現白絹病菌絲及褐色斑，於接種 5 d 後病斑漸擴大，於接種 7 d 時病斑凹陷並裂開，切開內部呈木栓化，病斑直徑大小約 2.5 cm 左右 (圖 2A)。而接種於「台農 71 號」葉用甘藷時，莖部出現水漬狀黃褐色病斑，而後逐漸變褐腐爛，土表面產生大量白絹病菌絲，並呈幅射狀擴展，最後植株整株萎凋並倒伏 (圖

表 1.　由 *Sclerotium rolfsii* 引起的甘藷白絹病發生調查。
Table 1.　Disease survey on circular spot disease of sweet potato caused by *Sclerotium rolfsii* in the field.

Location	Harvest time (month/year)	Disease incidence (%)
Yunlin Shuilin 1 (TN-57)	02/2015	53.0
Yunlin Shuilin 2 (TN-57)	02/2015	19.0
Yunlin Shuilin 3 (TN-57)	02/2015	0.0
Yunlin Shuilin 4 (TN-57)	03/2015	9.0
Yunlin Shuilin 5 (TN-57)	03/2015	4.5
Yunlin Shuilin 6 (TN-57)	03/2015	11.5
Changhua Fusing1 (TN-57)	02/2015	53.0
Changhua Fusing 2 (TN-57)	02/2015	21.5
PingTung YenPu 1 (TN-57)	03/2015	6.0
PingTung YenPu 2 (TN-57)	03/2015	18.5
Taipei Jinshan 1 (TN-66)	09/2015	0.0
Taipei Jinshan 2 (TN-66)	09/2015	0.0
Taipei Jinshan 3 (TN-66)	09/2015	0.0
Taipei Wanli 1 (TN-66)	09/2015	0.0
Taipei Wanli 2 (TN-66)	09/2015	0.0
Changhua Dancheng 1 (TN-66)	11/2015	0.0
Changhua Dancheng 2 (TN-66)	11/2015	0.0

2B)。由甘藷植株所分離之白絹病菌接種在馬鈴薯塊莖及紅蘿蔔塊根上亦具有病原性，於接種後 10 d，紅蘿蔔完全布滿菌絲並腐爛，馬鈴薯病斑直徑則約為 2.0 cm 左右 (圖 2C、2D)。

溫度甘藷白絹病菌菌絲生長之影響

甘藷白絹病菌 SCL-003 菌株於 15–20℃生長較其他培養溫度緩慢，20℃培養時於培養 7 d 時菌絲長滿約 9 cm 之培養皿，15℃培養則於培養後 10 d 菌絲長滿約 9 cm 培養皿；30℃生長最快速，培養後 3 d 菌絲長滿 9 cm 培養皿，於 40℃培養時，菌絲均不生長 (圖 3)。

藥劑對甘藷白絹病菌菌絲生長之影響

為篩選甘藷白絹病之有效防治藥劑，於室內進行 9 種藥劑對白絹病菌絲生長之影響，試驗結果如表 2 所示。兩測試之甘藷白絹病菌株在 50.0% 福多寧、75.0% 滅普寧、7.5% 依普座、23.0% 菲克利及 25.0% 賓得克利 10 mg a.i. L^{-1} 有效濃度下，其菌絲生長抑制率均可達 84% 以上之抑制率，當培養基內含 100 mg a.i. L^{-1} 有效濃度時則可完全抑制菌絲之生長。貝芬同及賽氟滅需於 100 mg a.i. L^{-1} 有效濃度時方分別有 80% 之生長抑制率。撲滅寧及保粒黴素在於 100 mg a.i. L^{-1} 有效濃度時對甘藷白絹病菌之菌絲生長抑制率則分別僅有約 15% 及 40% 左右之抑制率。

討論

本研究為國內針對由 *S. rolfsii* 引起之甘藷白絹病的首次完整報告，從本研究調查顯示甘藷一旦罹患白絹病後，賣相極差，且就國外資料顯示罹患甘藷白絹病 (Circular spot) 之甘藷會有苦澀味 (Clark *et al*. 2013)，因此造成農友莫大之損失。根據調查結果顯示，在台灣，甘藷白絹病目前僅發生在秋作之「台農 57 號」藷塊上，於春作及夏作較少發生。由於台灣的春、夏作多種植「台農 66 號」，是否與品種之抗病性有關，則仍需進一步闡明。本試驗由白絹病病斑進行組織分離後發現確實有似 *S. rolfsii* 之菌體，經培養特性及核酸序列比對確定引起甘藷白絹之病原為 *S. rolfsii*，病原菌經接種在甘藷藷塊上亦引起白絹病徵，經再分離

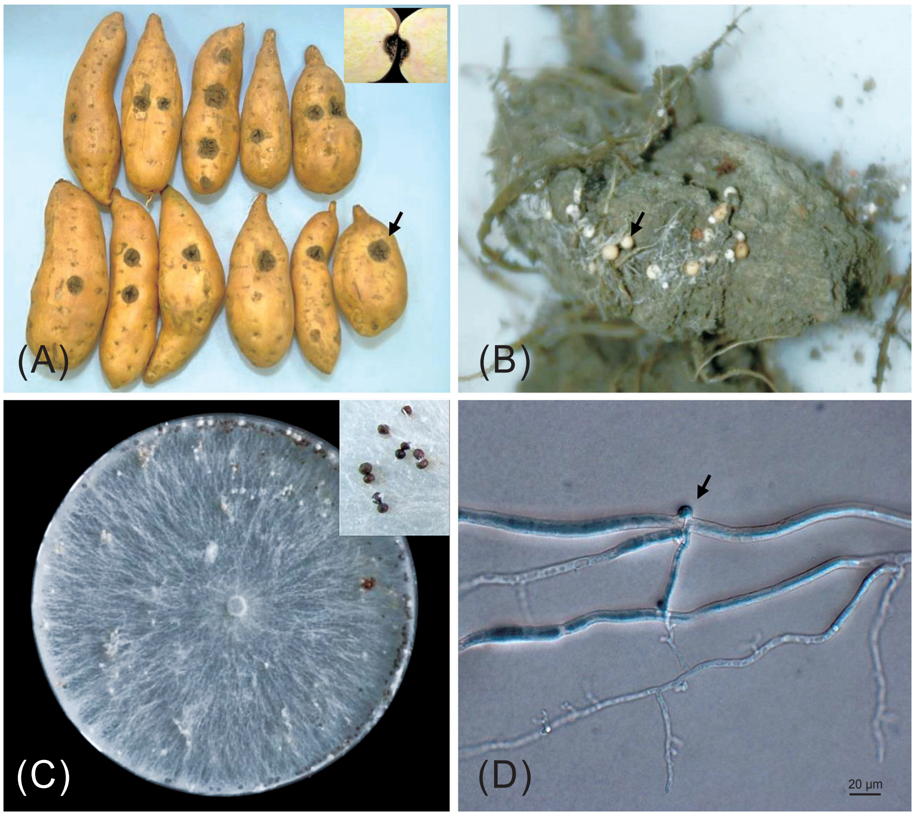


圖 1.　甘藷白絹病病徵 (箭頭所示) (A) 及菌核 (B)；*Sclerotium rolfsii* SCL-003 分離株培養於 PDA 之菌絲形態、菌核 (C) 及 *Sclerotium rolfsii* SCL-003 分離株培養於 WA 之扣子體 (箭頭所示) (D)。

Fig. 1.　Circular spot symptom (arrow) of naturally infected storage root of sweet potato ‘TN57’ (A) and white to brown sclerotia production on the field soil (B). Colony of *Sclerotium rolfsii* SCL-003 isolate cultured on PDA showing white mycelium and dark brown sclerotia (C). Clamp connection (arrow) of hyphae in *Sclerotium rolfsii* SCL-003 cultured on 1.5% WA for 2 days (D).

亦可得到相同病原，證明其對甘藷之病原性，而由甘藷分離之 *S. rolfsii* 病原對紅蘿蔔及馬鈴薯亦具有致病性。此外，在溫度對其菌絲生長之影響結果顯示，15–35℃本菌均可生長，其中 30℃為其生長最適溫度，此結果與 Chen *et al.* (2002) 由星辰花分離之 *S. rolfsii* 結果有相似性。*S. rolfsii* 為一土壤傳播性真菌，寄主範圍廣泛，可為害 100 科 500 種以上植物，幾乎全世界均有病例發生 (West 1961)，而以熱帶及亞熱帶地區發生較為嚴重；台灣地處亞熱帶，故本菌引起之病例相當多，經記載其寄主包已有 45 科 131 種 (Hsieh *et al.* 1990)，然本病原在甘藷藷塊上所造成之白絹病徵未曾正式報告記錄。

白絹病在「台農 57 號」甘藷之病徵與國外報告之描述相似 (Clark *et al.* 2013)，值得注意的是本病在「台農 57 號」鮮少造成甘藷完全腐爛，大多具有侷限性，病斑圓形，直徑大小鮮少超過 3 cm，深度亦不超過 2 cm，此與國外報告中顯示大多甘藷白絹病病斑直徑大多為 1–2 cm，深度不超過 5 mm 稍有差異性，此可能與品種間之差異性有關。此種侷限性病徵亦與 *S. rolfsii* 在紅蘿蔔上造成腐爛病徵不同。究其原因可能與甘藷含有抗菌物質對 *S. rolfsii* 之侵染產生抑制作用，導致無法造成藷塊腐爛等嚴重病徵。已知酚類化合物之存在與多數植物之抗病性相關，同時甘藷可經由傷害或病原菌刺激誘導產生 furanoterpene 及 butenolide 等

臺灣農業研究66(2) 08-倪蕙芳.indd　162　　2017/6/12　下午 09:01:47

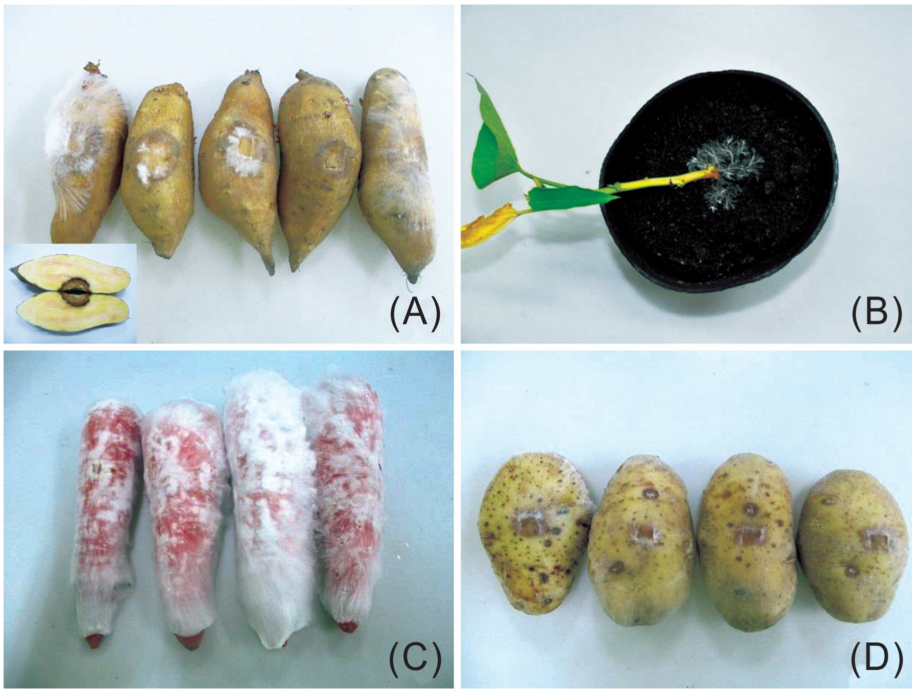


圖 2. 甘藷白絹病病原菌 (*Sclerotium rolfsii*) SCL-003 接種於甘藷 (A)、甘藷幼苗「台農 71 號」(B)、紅蘿蔔 (C) 及馬鈴薯 (D) 之病徵。

Fig. 2. Disease symptoms showing on sweet potato storage root (A), sweet potato seedling ‘TN71’ (B), carrot tuber (C), and potato tuber (D) after inoculation with *Sclerotium rolfsii* SCL-003 isolate for 10 days.

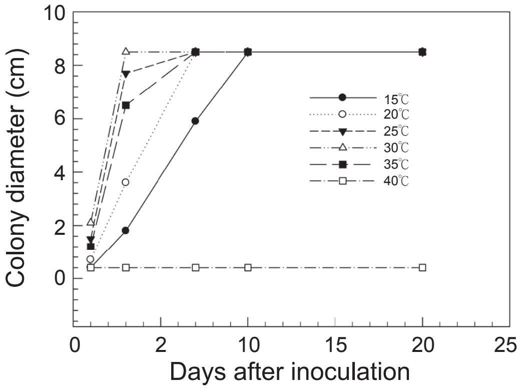


圖 3. 溫度對甘藷白絹病菌 *Sclerotium rolfsii* SCL-003 分離株菌絲生長之影響。

Fig. 3. Effect of temperature on the mycelial growth of *Sclerotium rolfsii* SCL-003 isolated from circular spot disease of sweet potato.

抗真菌物質及增加 caffeic acid 與其衍生物之量 (Stange *et al*. 2001)。本研究中甘藷白絹病之病徵受侷限及田間實際調查結果顯示，「台農 66 號」較不易發生白絹病等現象是否與此些酚類化合物之誘導或含量不同有關，則有待進一步闡明。

由田間採集之甘藷病斑若已乾褐，常不易再分離到 *S. rolfsii*，大多僅能分離到木黴菌 (*Trichoderma* spp.)，而木黴菌拮抗 *S. rolfsii* 之研究，已有相當多之報告闡述，顯示未來木黴菌之應用應可做為甘藷白絹病防治之方法之一。另外，有關本病害之發生，國外研究大多著重在由 *S. rolfsii* 引起甘藷苗之 Southern blight 病害，在苗床造成大面積損失 (Jenkins & Averre 1986)，本研究將 *S. rolfsii* 接種在「台農 71 號」葉用甘藷上，發現能造成甘藷苗腐爛枯死，為 Southern blight 典型病徵。在台灣雖仍未有此病害造成甘藷苗大量死亡之記錄，然仍應加強防範避免「台農 71 號」甘藷苗受其危害。至於「台農 57 號」品種之甘藷苗在田間未曾發現有苗期受到 *S. rolfsii* 危害之現象，則可能與甘藷苗期之栽培環境不利發病有關，未

表 2. 不同殺菌劑對甘藷白絹病菌 *Sclerotium rolfsii* SCL-001 及 SCL-003 菌絲生長之影響。

Table 2. Effects of different synthetic fungicides on inhibition of mycelial growth of *Sclerotium rolfsii* SCL-001 and SCL-003 isolate.

	Inhibition (%)[z]					
	SCL-001			SCL-003		
Fungicide	1 mg a.i. L^{-1}	10 mg a.i. L^{-1}	100 mg a.i. L^{-1}	1 mg a.i. L^{-1}	10 mg a.i. L^{-1}	100 mg a.i. L^{-1}
10.0% polyoxins WP	1.1 f[y]	2.5 f	45.0 d	1.7 f	12.2 f	42.8 d
50.0% procymidone WP	0.0 f	14.5 e	19.1 e	0.0 f	9.9 g	14.0 e
50.0% flutolanil WP	85.0 b	100.0 a	100.0 a	88.2 b	100.0 a	100.0 a
50.0% carbendazim + iprodione WP	0.3 f	41.9 d	80.2 c	0.0 f	36.6 e	89.0 c
75.0% mepronil WP	66.9 c	84.8 b	100.0 a	67.1 c	89.2 c	100.0 a
7.5% epoxiconazole SC	57.9 d	100.0 a	100.0 a	65.8 c	95.3 b	100.0 a
21.0% thifluzamide SC	11.5 e	55.1 c	91.6 b	11.7 e	61.3 d	95.9 b
23.0% hexaconazole SC	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
25.0% pencycuron + tebuconazole SC	80.6 b	100.0 a	100.0 a	59.9 d	100.0 a	100.0 a
LSD (P = 0.05)	5.7	1.9	3.0	2.4	2.1	1.3

[z] Inhibition (%) = [(Diameter of mycelial growth on PDA without fungicide – diameter of mycelial growth on PDA with fungicides)/ diameter of mycelial growth on PDA without fungicide] × 100%.

[y] Means followed by the same letter(s) within a column are not significantly different at 5% by LSD test.

來將持續針對環境因子對甘藷白絹病發生影響進行探討。

本研究進行 9 種藥劑對 *S. rolfsii* 菌絲生長抑制之篩選，結果以 50.0% 福多寧、75.0% 滅普寧、7.5% 依普座、23.0% 菲克利及 25.0% 賓得克利等對白絹病菌菌絲生長具有完全抑制之效果。目前僅有福多寧延伸推薦在甘藷白絹病或苗期白絹病 (southern blight) 之防治上，然而由於其推薦方法為發病初期開始施藥於植株莖基部，以後每隔 10 d 施藥 1 次，連續 3 次，而甘藷白絹病病徵發生在地下部藷塊，並無法在發病初期即行判定，因此未來應再進行詳細的相關田間試驗，以確認最適防治施用時機方法，作為農友施用之參考依據。目前僅知甘藷白絹病多在甘藷肥大後期發生 (Clark *et al*. 2013)，以台灣秋作甘藷生長期程，大約種植 1.5–2 mo 會開始進入藷塊形成期，種植後 4–5 mo 採收。因此，建議在白絹病好發田區，可以在甘藷種植 1 mo 後進行施藥，每隔 10 d 施藥 1 次，連續 3 次，應可得到較佳之防治效果。此外，由於 *S. rolfsii* 腐生能力強，在土壤中可占據未腐熟之有機質，菌絲快速生長並形成大量菌絲 (Boyle 1961)，而台灣栽培甘藷常與水稻輪作，水稻採收後之殘體可能提供了 *S. rolfsii* 有利之生長基質。本試驗所篩選的依普座、菲克利、賓得克利不僅對 *S. rolfsii* 菌絲生長具有極佳之抑制效果外，其等亦已為水稻紋枯病之用藥，因此可建議於白絹病好發之甘藷田。於水稻輪作時，使用上述藥劑防治水稻紋枯病時一併增加田間白絹菌核除滅之機會。

本研究結果釐清了台灣田間甘藷產生褐色圓斑之病害為由 *S. rolfsii* 病原所引起，此一病原寄主範圍極廣，在防治上尤其需注意甘藷輪作的作物是否仍為寄主植物，以免田間感染源逐年加重。目前此病害主要在「台農 57 號」品種甘藷田發生，針對罹病田除加強上述有效藥劑防治外，栽種「台農 66 號」品種或可降低病害之發生率。此外，葉用甘藷極為感病，田間栽培時應特別注意 *S. rolfsii* 之侵染，加強田間衛生，以免病害大面積發生。

引用文獻

Anonymous. 1998. FAO Production Yearbook. Vol. 52. FAO of the UN. Rome, Italy. 239 pp. (in Chinese)

Boyle, L. W. 1961. The ecology of *Sclerotium rolfsii* with emphasis on the note of saprophytic media. Phytopathology 51:117–119.

Chen S. C. and A. S. Cheng. 2002. The physiological

properties of Sclerotium blight fungus on statice plant and its control fungicides screening *in vitro*. Tainan District Agricultureal Improvement Station. 40:26–33. (in Chinese with English abstract)

Chen, Y. J., Y. S. Lin, and W. S. Chung. 2012. Bacterial wilt of sweet potato caused by *Ralstonia solanacearum* in Taiwan. J. Gen. Plant Pathol. 78:80–84.

Clark, C. A., D. M. Ferrin, T. P. Smith, and G. J. Holmes. 2013. Compendium of Sweet Potato Disease, Pests, and Disorders. 2nd ed. APS Press. St. Paul, MN. 160 pp.

Hsieh, T. F., C. C. Tu, and W. H. Tsai. 1990. Effects of temperature and moisture on the occurrence of lily southern blight caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. J. Agric. Res. China 39:315–324. (in Chinese with English abstract)

Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathology Society. Taichung, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)

Huang, C. W., M. F. Chuang, S. S. Tzean, H. R. Yang, and H. F. Ni. 2012. Occurrence of foot rot disease of sweet potato caused by *Phomopsis destruens* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 21:47–52. (in Chinese with English abstract)

Jenkins, S. F. and C. W. Averre. 1986. Problems and progress in integrated control of southern blight of vegetables. Plant Dis.70:614–619.

Lai, Y. C., L. Li, C. H. Liao, T. T. Li, Z. W. Xin, and S. L. Gaun. 2008. The achievement and prospect of sweet potato breeding in Taiwan. p.22–31. *in*: Sweet Potato Research and Development. (Lo, H. F., ed.) Department of Horticulture and Biotechnology, Chinese Culture University. Taipei, Taiwan. 189 pp. (in Chinese with English abstract)

Mordue, J. E. M. 1974. *Sclerotium rolfsii*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. No. 410. Commonwealth Mycological Institute. Kew, UK. 686 pp.

Shen, W. Q. 1992. Development and Application of Monoclonal Antibodies against the Mycoplasma-like Organism (MLO) Associated with Sweet Potato Witches' Broom. Master Thesis, Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. 94 pp. (in Chinese with English abstract)

Stange Jr., R. R., S. L. Midland, G. J. Holmes, J. J. Sims, and R. T. Mayer. 2001. Constituents from the periderm and outer cortex of *Ipomoea batatas* with antifungal activity against *Rhizopus stolonifer*. Postharvest Biol. Technol. 23:85–92.

Wang, H., M. Qi, and A. J. Culter. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21:4153–4154.

Wang, L. Y. 2007. Coat Protein Sequence Analysis, Serological Properties and Development of Detection Tools for Two Filamentous Viruses Isolated from Sweet Potato. PhD Thesis, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 127 pp. (in Chinese with English abstract)

West, E. 1961. *Sclerotium rolfsii*, history, taxonomy, host range, and distribution. Phytopathology 51:108–109.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. p.315–322. *in*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds.) Academics Press. San Diego, CA. 482 pp.

Circular Spot of Sweet Potato Caused by *Sclerotium rolfsii* in Taiwan

Chiao-Wen Huang[1], Hong-Ren Yang[2], Ching-Yi Lin[3], Sui-Li Hsu[4], Su-Yu Lai[4], Wen-Chi Ko[4], and Hui-Fang Ni[5,*]

Abstract

Huang, C. W., H. R. Yang, C. Y. Lin, S. L. Hsu, S. Y. Lai, W. C. Ko, and H. F. Ni. 2017. Circular spot of sweet potato caused by *Sclerotium rolfsi* in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 66(2):158–166.

In 2015, a severe disease outbreak on sweet potato storage root with the symptoms of circular yellowish brown to brown lesions occurred in Chunghua, Yunlin, and Pingtung areas. The pathogen isolated from the diseased tissue had white mycelium, clamp connection, and it produced brown sclerotia, which was identified as *Sclerotium rolfsii* Sacc. based on these morphological characters and ITS sequence. The growth temperature of pathogen isolates ranged from 15 to 35℃, and the optimum growth temperature was 30℃. The pathogen isolate, SCL-003, showed pathogenic ability on sweet potato storage roots and seedlings. Nine fungicides were selected for evaluating the inhibition effect on mycelial growth of two pathogen isolates (SCL-001 and SCL-003). The results showed that the effective fungicides with more than 89% inhibition rate were 50% flutolanil, 75.0% mepronil, 7.5% epoxiconazole, 23.0% hexaconazole, and 25.0% pencycuron + tebuconazole with 10 mg a.i. L^{-1} dilution concentration. This is the first report of circular spot disease on sweet potato caused by *Sclerotium rolfsii* in Taiwan.

Key words: Sweet potato (*Ipomoea batatas*), Circular spot diseases, Fungicide screening.

Received: August 3, 2016; Accepted: October 5, 2016.

[*] Corresponding author, e-mail: hfni@dns.caes.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Fellow and Director, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
[3] Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
[4] Research Assistants, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
[5] Associate Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

臺灣農業研究66(2) 08-倪蕙芳.indd 166 2017/6/12 下午 09:01:51

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(2):167–170 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06602.09 研究簡報

木耳萃取物改善卵巢切除大鼠血脂血糖代謝及骨質密度

楊惠婷[1] 劉虹君[2] 楊淑惠[3,*]

摘要

楊惠婷、劉虹君、楊淑惠。2017。木耳萃取物改善卵巢切除大鼠血脂血糖代謝及骨質密度。台灣農業研究 66(2):167–170。

本研究以卵巢切除 (OVX) 之動物模式，評估餵食木耳萃取物對更年期症狀的影響。Sprague Dawley (SD) 雌鼠經卵巢切除後分成 4 組，正常飼料組及給予 0.125、0.25 及 0.5 g kg^{-1} 木耳萃取物組。研究顯示給予 OVX 大鼠木耳萃取物，可以增加血液的高密度脂蛋白膽固醇濃度，降低血液低密度脂蛋白膽固醇濃度及三酸甘油酯濃度、並可降低空腹血糖濃度及肝臟轉胺酶活性。OVX 大鼠的骨骼密度與木耳萃取物攝食有相關性。初期研究顯示，攝食木耳萃取物可以改善卵巢切除大鼠血脂、血糖代謝及增加骨質密度。

關鍵詞：木耳萃取物、更年期、卵巢切除、血液生化值、骨質密度。

前言

「更年期」為女性自正常的卵巢功能逐漸衰退至不具功能的過渡期 (Dell *et al*. 2000)，這期間因為體內雌激素 (estrogen) 的驟然下降，可能引起身體上許多不適，包括脂蛋白脂解酶活性改變，心臟血管疾病與血管疾病發生率增加，以及和這些症狀相關的血液生化值變化：總膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇及三酸甘油酯值明顯高於停經前 (Parrish *et al*. 1967)，另也會發生血中鈣含量不足、骨密度急遽下降 (Brenner 1982) 等。研究證實木耳具有多方面的藥理作用，如降低血糖 (Yuan *et al*. 1998)、降低總膽固醇與低密度脂蛋白膽固醇，緩和動脈粥狀硬化 (Chen *et al*. 2008)、激活巨噬細胞 (Sheu *et al*. 2004) 及抑制血小板凝集、減少血栓形成 (Yoon *et al*. 2003) 等功效。

材料與方法

本試驗取木耳 (*Auricularia polytricha*) 乾燥之子實體，加入 10× 體積去離子水復水後，加熱萃取，趁熱過濾，收集濾液，經冷凍乾燥為木耳萃取物 (APE)。以 5 週齡 SD (Sprague Dawley) 雌鼠為實驗動物，動物育養 1 wk 後施行卵巢切除術 (ovariectomized; OVX)。經 3 wk 復原期，先由尾靜脈採血後進行隨機組分成 4 組，正常飲食組 (V0)、添加不同劑量木耳萃取物組 V1 (0.125 g kg^{-1} BW APE), V2 (0.25 g kg^{-1} BW APE), V3 (0.5 g kg^{-1} BW APE)。於飼育期 4 wk 結束後犧牲實驗動物，採集血液檢體及下肢股骨進行生化分析及切片判讀。

結果與討論

給予卵巢切除動物 0.125–0.5 g kg^{-1} 木耳萃取物，血脂肪指標分析顯示，V3 餵食高劑量木耳萃取物組的三酸甘油酯 30.3 ± 0.63 mg dL^{-1}、低密度脂蛋白膽固醇 (LDL-C) 8.8 ± 0.28 mg dL^{-1} 濃度，顯著低於 V0 正常飲食組；V3 組的高密度脂蛋白膽固醇 (HDL-C) 濃度 25.1 ±

投稿日期：2016 年 7 月 1 日；接受日期：2016 年 9 月 23 日。
* 通訊作者：debbie@fthes-tari.gov.tw
[1] 中國醫藥大學營養系副教授。台灣 台中市。
[2] 中國醫藥大學營養系研究生。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所經營利用系副研究員兼主任。台灣 高雄市。

臺灣農業研究66(2) 09-楊淑惠.indd 167 2017/6/12 下午 09:02:07

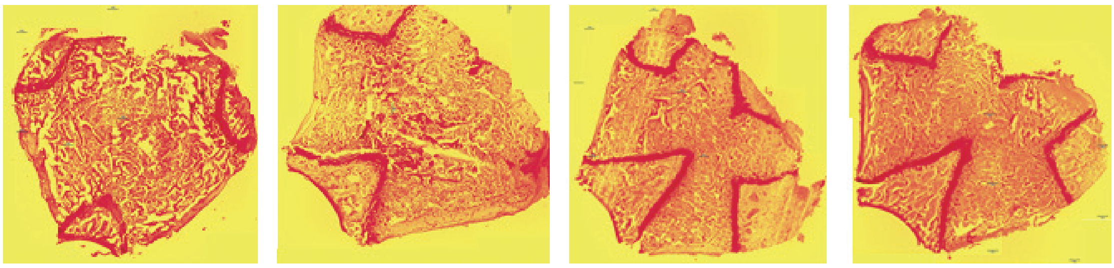
1.3 mg dL^{-1} 顯著高於 V0 組，如表 1 所示。肝臟功能指標分析，V0 正常飲食組天門冬胺酸轉胺酶 (AST) 濃度 139.00 U L^{-1} 及丙胺酸轉胺酶 (ALT) 濃度 60.00 U L^{-1}，與 10 週齡無特定病原 SD 大鼠的血清生化值 (Fang *et al.* 1996) 比較指數偏高，攝食木耳萃取物後各組 AST 濃度 (79.67–98.17 U L^{-1}) 及 ALT (41.25–44.67 U L^{-1}) 濃度均顯著低於 V0 組，推測與改善發炎現象有關。腎臟功能指標分析，V0 正常飲食組的白蛋白 (albumin) 濃度 3.7 mg dL^{-1}、肌酸酐 (creatinine) 濃度 0.76 mg dL^{-1}、尿素氮 (BUN) 濃度 20.1 mg dL^{-1}，與 10 週齡大鼠生化值比較數值偏高，攝食木耳萃取物各組，OVX 大鼠腎臟功能指數顯著下降，尿素氮濃度 14.8–16.8 mg dL^{-1}，尿酸濃度 0.9–1.4 mg dL^{-1}。在空腹血糖值分析顯示，V0 組的血糖值 150.4 mg dL^{-1} 遠高於 10 週齡大鼠生化值，攝食木耳萃取物後各組血糖值 110.2–122.6 mg dL^{-1} 均顯著低於 V0 組，下降至正常範圍，顯示食用木耳萃取物具有改善 OVX 大鼠血脂、血糖代謝之功效。骨密度切片分析如圖 1、圖 2 所示，V0 正常飲食組骨質密度相對低於攝食木耳萃取物各組，將圖 1 之骨組織密度量化後，V0 組的骨組織密度 45%，攝食木耳萃取

表 1. 飲食中添加不同劑量的木耳萃取物對於卵巢切除雌鼠血漿生化值之影響。

Table 1. Effects of different dietary on plasma parameters of ovariectomized rats.

Plasma parameter	V0[z]	V1	V2	V3
Total Cholesterol (mg dL^{-1})	86.6 ± 6.9	92.3 ± 8.3	81.8 ± 8.1	73.7 ± 4.5
HDL-C (mg dL^{-1})	20.7 ± 0.7	23.5 ± 1.7	23.2 ± 1.5	25.1 ± 1.3*[y]
LDL-C (mg dL^{-1})	10.5 ± 0.3	11.0 ± 0.4	10.1 ± 0.3	8.8 ± 0.2*
Triglyceride (mg dL^{-1})	60.5 ± 4.7	38.0 ± 8.3*	43.0 ± 5.7*	30.3 ± 0.6*
AST (U L^{-1})	139 ± 44	87 ± 19*	98 ± 11*	80 ± 3*
ALT (U L^{-1})	60.0 ± 5.9	41.3 ± 9.4*	42.0 ± 5.6*	44.7 ± 7.2*
Albumin (mg dL^{-1})	3.7 ± 0.4	3.6 ± 0.3	3.6 ± 0.3	3.5 ± 0.2
Creatinine (mg dL^{-1})	0.76 ± 0.03	0.66 ± 0.04*	0.67 ± 0.02*	0.63 ± 0.01*
BUN (mg dL^{-1})	20.1 ± 1.4	14.8 ± 0.7*	16.1 ± 1.2*	16.8 ± 0.2*
Uric acid (mg dL^{-1})	2.2 ± 0.3	0.9 ± 0.1*	1.4 ± 0.1*	0.9 ± 0.1*
Glucose AC (mg dL^{-1})	150 ± 7	123 ± 8*	110 ± 8*	116 ± 5*

[z] V0: OVX rat fed on chow diet; V1: OVX rat fed on chow diet supplemented with 0.125 g kg^{-1} BW APE; V2: OVX rat fed on chow diet supplemented with 0.25 g kg^{-1} BW APE; V3: OVX rat fed on chow diet supplemented with 0.5 g kg^{-1} BW APE.
[y] All values are presented as mean ± SEM (n = 6).
* Significantly different from each group (P < 0.05).



V0 V1 V2 V3

圖 1. 飲食中添加不同劑量的木耳萃取物之卵巢切除雌鼠骨組織切片。

Fig. 1. Bone slice of different dietary of ovariectomized rats. V0: OVX rat fed on chow diet; V1: OVX rat fed on chow diet supplemented with 0.125 g kg^{-1} BW APE; V2: OVX rat fed on chow diet supplemented with 0.25 g kg^{-1} BW APE; and V3: OVX rat fed on chow diet supplemented with 0.5 g kg^{-1} BW APE.

臺灣農業研究66(2) 09-楊淑惠.indd 168 2017/6/12 下午 09:02:07

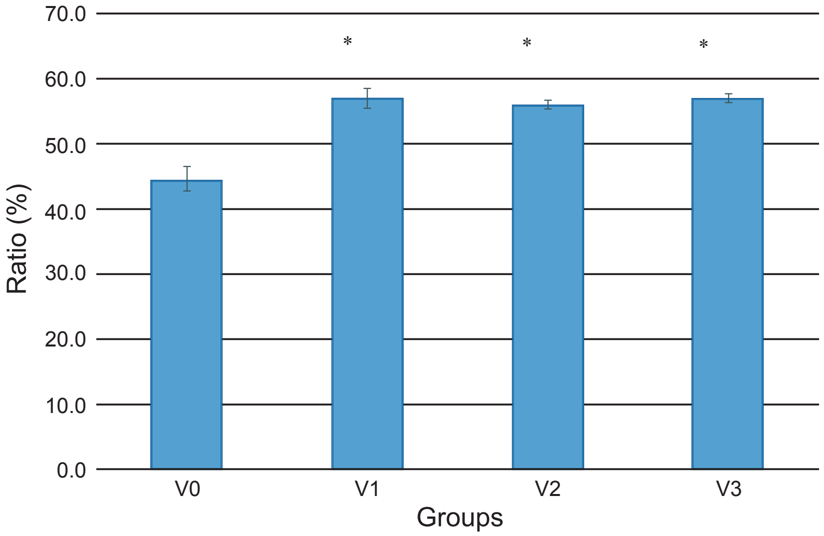


圖 2. 飲食中添加不同劑量的木耳萃取物對於卵巢切除雌鼠骨組織密度之影響。

Fig. 2. Effects of different dietary on bone density of ovariectomized rats. V0: OVX rat fed on chow diet; V1: OVX rat fed on chow diet supplemented with 0.125 g kg^{-1} BW APE; V2: OVX rat fed on chow diet supplemented with 0.25 g kg^{-1} BW APE; and V3: OVX rat fed on chow diet supplemented with 0.5 g kg^{-1} BW APE. * Significantly different from each group ($P < 0.05$).

物各組的骨組織密度 55–57%，較為緻密，顯示攝食木耳萃取物可以顯著增加 OVX 大鼠的骨質密度，推測與減少鈣質流失有關，各項代謝機制及有效成分，有待繼續探討。

引用文獻

Brenner, P. E. 1982. The menopause. West J. Med. 136:211–219.

Chen, G. Y., C. Luo, B. P. Li, B. Li, Y. Guo, and Y. Li. 2008. Effect of polysaccharide from *Auricularia auricula* on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of ICR mice fed a cholesterol-enriched diet. J. Food Sci. 73:H103–H108.

Dell, D. L. and D. E. Stewart. 2000. Menopause and mood. Postgrad Med. 108(3):34–43.

Fang, B. H., W. P. Liaw, H. L. Lee, and S. C. Lin. 1996. Hematological values and serum chemistry for specific pathogen free Sprague Dawley rats. J. Chinese Soc. Vet. Sci. 22:374–380.

Parrish, H. M., C. A. Carr, D. G. Hall, and T. M. King. 1967. Time interval from castration in premenopausal women to development of excessive coronary atherosclerosis. Amer. J. Obstet. Gynecol. 99:155–162.

Sheu, F., P. J. Chien, Y. F. Chen, and C. L. Chin. 2004. Isolation and characterization of an immunomodulatoryprotein (APP) from the Jew's Ear mushroom *Auricularia polytricha*. Food Chem. 87:593–600.

Yoon, S. J., M. Yu, Y. R. Pyun, J. K. Hwang, D. C. Chu, L. R. Juneja, and P. A. Mourao. 2003. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. Thromb. Res. 112:151–158.

Yuan, Z., P. He, J. Cui, and H. Takeuchi. 1998. Hypoglycemic effect of water-soluble polysaccharide from Auricularia auricula-judae Quel. on genetically diabetic KK-Ay mice. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62:1898–1903.

Auricularia polytricha Extracts Improve Blood Lipid Blood Sugar Metabolism and Bone Density of Ovariectomized Rats

Hui-Ting Yang[1], Hung-Chun Liu[2], and Shu-Hui Yang[3,*]

Abstract

Yang, H. T., H. C. Liu, and S. H. Yang. 2017. *Auricularia polytricha* extracts improve blood lipid blood sugar metabolism and bone density of ovariectomized rats. J. Taiwan Agric. Res. 66(2):167–170.

In this study, the efficacy of *Auricularia polytricha* extracts (APE) improving the menopausal symptoms was evaluated by an ovariectomized model. Female Sprague Dawley rats were divided into 4 groups after surgery, including OVX fed on chow diet, and OVX fed on 0.125, 0.25, or 0.5 g kg^{-1} APE groups. Studies have shown that OVX SD rats supplemented with APE could increase plasma HDL-C concentration, but decreased LDL-C concentration, triglyceride levels, fasting glucose and liver transaminase activity. Bone density showed correlated with APE ingesting. In short, the *Auricularia polytricha* extract intake can improve lipid metabolism and increase bone density on ovariectomized rats.

Key words: *Auricularia polytricha* extracts, Menopause, Ovariectomy, Blood biochemistry, Bone density.

Received: July 1, 2016; Accepted: September 23, 2016.

* Corresponding author, e-mail: debbie@fthes-tari.gov.tw
1 Associate Professor, Department of Nutrition, China Medical University, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Graduate student, Department of Nutrition, China Medical University, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Associate Research Fellow and Head, Department of Management and Utilization, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

臺灣農業研究66(2) 09-楊淑惠.indd 170 2017/6/12 下午 09:02:08

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chang, Ruey-Jang
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chang, Yung-Ho
Department of Food and Nutrition, Providence University
Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Chen, Iou-Zen
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Chen, Su-Ming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University
Chen, Yu-Hui
Department of Agricultural Economics, National Taiwan University
Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University
Chung, Wen-Hsin
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute
Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Huang, Yuh-Ming
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Juang, Kai-Wei
Department of Agronomy, National Chiayi University
Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University
Ko, Chiun-Cheng
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University
Ku, Hsin-Mei
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Kuo, Bau-Jeng
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Lin, Huey-Ling
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Lin, Yann-Rong
Department of Agronomy, National Taiwan University
Liu, Li-Yu
Department of Agronomy, National Taiwan University
Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station
Lu, Kuang-Hui
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Shen, Wei-Chiang
Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University
Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute
Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Tzou, Yu-Min
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Wang, Shu-Jen
Department of Agronomy, National Taiwan University
Wu, Wen-Jer
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University
Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

Editorial Assistants

Ku, Pei-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research
Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research
Wu, Huei-Ching
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

Consultant to Editorial Assistants

Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 66 No. 2 June 30, 2017

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture
Publisher Junne-Jih Chen
Editor-in-Chief Chwen-Ming Yang
Address No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission http://aspers.airiti.com/JTAR

Press Airiti Press Inc.
Address 18F., No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel +886-2-2926-6006
E-mail press@airiti.com

Price NT$ 175 (per copy)
Distributor 1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC
GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207
2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC
Tel: +886-4-2226-0330